

Europäisches Patentamt

(19)

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 451 823 A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **91105702.4**

(51) Int. Cl. 5: **C12N 15/85, C12N 15/12,  
C07H 21/04, C12P 21/00**

(22) Anmeldetag: **10.04.91**

(30) Priorität: **11.04.90 DE 4011751  
19.04.90 DE 4012526**

(71) Anmelder: **Consortium für elektrochemische  
Industrie GmbH  
Zielstattstrasse 20  
W-8000 München 70(DE)**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**16.10.91 Patentblatt 91/42**

(72) Erfinder: **Hartl, Peter, Dr. Dipl.-Chem.  
Kruenerstrasse 89  
W-8000 München 70(DE)**  
Erfinder: **Brem, Gottfried, Prof. Dr. Dr.  
Larezhausen  
W-8893 Hilgertshausen(DE)**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE**

(54) **DNA-Konstrukte zur Expression von Proteinen in der Milchdrüse transgener Säugetiere.**

(57) Die Erfindung betrifft ein rekombinantes DNA-Konstrukt zur Expression von Proteinen in der Milchdrüse transgener Säugetiere und nachfolgender Sekretion in die Milch, das die folgenden DNA-Bereiche in der angegebenen Reihenfolge und in funktioneller Verknüpfung zueinander enthält:

- (1) eine Transkriptions-Kontrollregion aus einem oder mehreren spezifisch in der Milchdrüse aktivierte Genen,
- (2) ein erster DNA-Sequenzbereich, der nicht translatiert wird,
- (3) eine DNA-Sequenz, die für ein Signalpeptid kodiert, das eine Sekretion in die Milch erlaubt,
- (4) eine DNA-Sequenz, welche die genetische Information für ein heterologes Peptid oder ein Protein enthält und
- (5) eine DNA-Sequenz, die eine Polyadenylierungsstelle und ein Transkriptions-Terminationssignal enthält.

Die Erfindung betrifft weiterhin einen rekombinanten Vektor, der ein solches Konstrukt enthält, sowie Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus der Milch transgener Tiere, in deren Genom ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt integriert ist.

EP 0 451 823 A2

Seit langem ist eine Gewinnung von Proteinen wie z.B. Albumin, Rennin, Interleukinen, Interferonen, Blutgerinnungsfaktoren, Insulin, Wachstumshormonen oder Somatostatinen aus Körperflüssigkeiten oder Gewebeextrakten von Mensch und Tier bekannt. Ebenso bekannt sind die Probleme, die dabei auftreten: virale Infektionen (AIDS, Hepatitis) oder Immunreaktionen (Insulin). Weiterhin ist in vielen Fällen auch eine 5 Befriedigung der Nachfrage mit diesen Verfahren der Proteingewinnung nicht möglich (Insulin aus Schweinen, Rennin aus Kälbern).

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Proteinen besteht in der chemischen Vollsynthese. Dies ist jedoch nur bei Proteinen mit weniger als 50 Aminosäuren möglich. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens beruht auf der falschen Faltung und dem Fehlen der Glykosylierung bei chemisch synthetisierten Proteinen.

10 Anreicherungsverfahren von rekombinanten Proteinen aus Bakterien und Hefezellkulturen haben den Nachteil einer geringen Ausbeute, oftmals sind auch die Proteine falsch gefaltet (inclusion bodies), besitzen keine (Bakterien) oder die falsche (Hefen) Glykosylierung oder sie können aufgrund der Konstruktionsmöglichkeiten nur mit einer veränderten Aminosäurenzusammensetzung hergestellt werden. Des Weiteren enthalten die zur Herstellung verwendeten Mikroorganismen oft toxische Substanzen, die eine Anwendung in der 15 Lebensmittelindustrie nicht zulassen (E. coli), oder bei der medizinischen Anwendung zu Immunreaktionen führen können. Diese Probleme ziehen kostenintensive Verfahren zur Aufreinigung und/oder Aktivierung der rekombinanten Proteine nach sich.

Eine weitere Möglichkeit beruht auf der Gewinnung von rekombinanten Proteinen aus Kulturen höherer 20 Zellen (Abstammung: Mensch, Tier). Geringe Ausbeuten und mögliche Kontaminationen (DNA, Fremdproteine) führen auch bei dieser Art der Herstellung zu hohen Kosten.

In jüngster Zeit wurde die Produktion rekombinanter Proteine in der Milch transgener Tiere als Lösung dieser Probleme vorgeschlagen (R. Lathe et al., p. 91 bis p. 102 in: *Exploiting New Technologies in Animal Breeding*, Published by Oxford University Press 1986, eds. C. Smith, J.W.B. King and J.C. McKay). Die Erstellung transgener Tierlinien ist seit längerer Zeit möglich (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. 25 USA 78: 6376-80; Patente: WO 82/04443; WO 87/5325).

Die gewebespezifische Expression von Proteinen unabhängig von der Art der Proteine wurde nachgewiesen (Übersicht: Palmiter et Brinster, 1986, Ann. Rev. Genet. 20: 465-499). Auch die spezifische Expression von Proteinen in der Milchdrüse transgener Tiere ist bekannt (Stewart et al. 1984, Cell 38: 627-37; Gordon et al. 1987, BIO/TECHNOLOGY 5: 1183-87; Pittius et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 30 5874-78; Clark et al. 1989, BIO/TECHNOLOGY 7: 487-92; Andres et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1299-1303; WO 88/10118; WO 88/00239; EP 0279 582, WO 88/01648; EP 0264 166).

So beansprucht die EP-A-0 264 166 eine DNA-Sequenz, die ein Gen enthält, welches für ein Protein kodiert, wobei das Gen auf der DNA-Sequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines Milchprotein-Promotors aus Säugetieren ist, welcher nicht natürlicherweise die Transkription des Gens kontrolliert, wobei die DNA-Sequenz weiterhin einen Bereich enthält, der die Sekretion des Proteins ermöglicht.

Die WO 88/01648 beansprucht ein rekombinantes Expressionssystem, welches eine lactogen induzierbare regulatorische Region und eine strukturelle Region, die für ein heterologes Protein kodiert, enthält. Die regulatorische Region stammt vorzugsweise von  $\alpha$ -Lactalbumin.

Die EP-A-0 279 582 beansprucht eine rekombinante DNA, die eine Promotorsequenz, eine Enhancersequenz, eine Signalpeptidsequenz und eine kodierende Sequenz enthält, wobei die Promotor-, Enhancer- und Signalpeptid-Sequenz von mindestens einem Milchdrüsen-spezifischen Gen stammen und die Expression der kodierenden Sequenz in der Milchdrüse verbessern. Offenbart wird die Synthese des Ratten- $\beta$ -Caseins und eines Chloramphenicolacetyltransferase-Fusionsproteins in der Milchdrüse der Maus.

Die WO 88/10118 beansprucht eine DNA-Sequenz, die einen milchspezifischen Promotor oder einen 45 spezifisch im Brustgewebe aktivierten Promotor operativ mit einer DNA-Sequenz verknüpft enthält, die für ein rekombinantes Protein kodiert, wobei die Verknüpfung über eine DNA-Sequenz geschieht, die für ein Signalpeptid kodiert, das die Sekretion und Reifung des rekombinanten Proteins im Brustgewebe bewirkt. Gezeigt wird eine geringe Expression eines t-PA-Fusionsproteins in der Maus (0,2 bis 0,5  $\mu$ g/ml in der Milch) und im Schaf.

50 Die zur Expression von Proteinen in der Milchdrüse benutzten DNA-Konstrukte führten bisher in allen Fällen zu geringen Ausbeuten oder/und zu Fusionsproteinen, so daß im wesentlichen die zuvor beschriebenen Nachteile der bekannten Verfahren zur Proteingewinnung nicht beseitigt werden. Daher war es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, nach einem verbesserten Expressionssystem zur Gewinnung von Proteinen auch ohne Fusionsanteil aus der Milch transgener Tiere zu suchen, das hohe Ausbeuten des 55 gewünschten Proteins liefert sowie eine Aufreinigung des Proteins erleichtert.

Durch die vorliegende Erfindung werden diese Probleme gelöst. Die Erfindung beruht auf einem rekombinanten DNA-Konstrukt, das verschiedene Sequenzbereiche enthält, die einerseits zu einer hohen Expression gewünschter Proteine oder Peptide in der Milchdrüse von transgenen Tieren führen und

andererseits die Sekretion der gebildeten Proteine in die Milch veranlassen. Die Aktivierung des rekombinanten DNA-Konstrukts ist ausschließlich auf die Milchdrüse beschränkt.

Die verwendeten DNA-Sequenzbereiche werden erfindungsgemäß zu einem gewebespezifisch in der Milchdrüse aktiven DNA-Konstrukt zusammengefügt, das aus Promotor-, Enhancer- und Signalpeptidsequenzen sowie aus spezifischen 5'- und 3'-nichttranslatierten und -transkribierten DNA-Bereichen besteht. 5 Teile der verwendeten transkribierten DNA-Bereiche werden bei der Reifung des Primärtranskripts zur mRNA durch Spleißvorgänge entfernt. Des Weiteren enthält das DNA-Konstrukt auch einen für ein heterologes Protein oder ein Peptid kodierenden Bereich, der gegebenenfalls durch Introns unterbrochen sein kann. Diese DNA-Sequenzen werden funktionell zu einer operativen Einheit verknüpft, die in der Milchdrüse 10 positiv reguliert ist und zu einer hohen Proteinexpression führt. So bewirkt die Integration eines erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts in die Keimbahn von Kaninchen oder Rindern, daß die Milch der resultierenden transgenen Tiere eine hohe Konzentration der rekombinanten Proteine aufweist.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein rekombinantes DNA-Konstrukt zur Expression von Proteinen 15 in der Milchdrüse transgener Säugetiere und nachfolgender Sekretion in der Milch, das die im folgenden aufgeführten DNA-Bereiche in der angegebenen Reihenfolge und in funktioneller Verknüpfung zueinander enthält:

- (1) eine Transkriptions-Kontrollregion aus einem oder mehreren spezifisch in der Milchdrüse aktivierten Genen,
- (2) ein erster DNA-Sequenzbereich, der nicht translatiert wird,
- 20 (3) eine DNA-Sequenz, die für ein Signalpeptid kodiert, das eine Sekretion in die Milch erlaubt,
- (4) eine DNA-Sequenz, welche die genetische Information für ein heterologes Peptid oder ein Protein enthält und
- (5) eine DNA-Sequenz, die eine Polyadenylierungsstelle und ein Transkriptions-Terminationssignal enthält.

25 Der Begriff "funktionelle Verknüpfung" bedeutet, daß die einzelnen DNA-Sequenzen jeweils auf solche Weise miteinander verknüpft sind, so daß die Expression des erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts ein Vorläufer-Peptid oder -Protein ergibt, aus dem nach Abspaltung einer Signalsequenz direkt das gewünschte Peptid oder Protein, sofern gewünscht, ohne jeden Fusionsanteil entsteht. Die Verknüpfung der einzelnen DNA-Abschnitte zum erfindungsgemäßen DNA-Konstrukt erfolgt im Einzelfall mittels molekularbiologischer 30 Techniken, die dem Fachmann auf diesem Gebiet an sich bekannt sind. In einigen Fällen ist es möglich, Fragmente von Genen direkt durch Ligation miteinander zu verknüpfen. In den meisten Fällen ist es jedoch zur Herstellung eines erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts erforderlich, Fragmente von Genen über synthetisch hergestellte DNA-Fragmente zu verknüpfen. Weiterhin ist es auch möglich, das gesamte DNA-Konstrukt oder wesentliche Teile davon durch die Verknüpfung synthetischer DNA-Fragmente zu konstruieren.

35 Der Begriff "Transkriptions-Kontrollregion" bedeutet einen Promotor- und Enhancer-Bereich, der die gewebespezifische Initiation und Aktivierung der Transkription in der Milchdrüse eines transgenen Tieres ermöglicht. Die Transkriptions-Kontrollregion stammt dabei von mindestens einem speziell in der Milchdrüse aktivierten Gen, wie z.B. vom  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Lactoglobulinen oder von einem Mitglied der Caseingen-Familie, z.B. vom  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Transkriptions-Kontrollregion des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens, insbesondere vom Rind oder vom Kaninchen. Die Transkriptions-Kontrollregion muß nicht aus einem einzigen Gen stammen, es ist auch möglich, die zur gewebespezifischen Expression des DNA-Konstrukts erforderlichen Regulationselemente aus zwei oder mehreren Genen zu entnehmen.

40 Auf diese Transkriptions-Kontrollregion folgt ein erster DNA-Sequenzbereich, der nicht translatiert wird. Vorzugsweise enthält dieser Bereich eine Sequenz, die für das nichttranslatierte Exon I eines Gens aus der Caseinfamilie ( $\alpha$ -S<sub>1</sub>,  $\alpha$ -S<sub>2</sub>,  $\beta$ , K-Casein) kodiert, wobei besonders bevorzugt das Exon I aus dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen verwendet wird. Es folgt dann vorzugsweise eine DNA-Sequenz, die für ein erstes Intron kodiert, wobei die DNA-Sequenz am Exon/Intron-Übergang eine native Splice-Stelle eines Milchdrüsenspezifischen Gens, besonders bevorzugt des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens sein soll. Der restliche Bereich des Introns muß nicht aus dem Milchdrüsenspezifischen Gen stammen, vorzugsweise verwendet man jedoch das erste Intron aus dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen.

45 Die Verknüpfung der für das zu exprimierende Protein kodierenden DNA-Sequenz mit den spezifisch in der Milchdrüse zu hoher Expression führenden DNA-Sequenzen geschieht über eine DNA-Sequenz, die für ein Signalpeptid kodiert, welche zur Sekretion des Proteins aus den Zellen der Milchdrüse in die Milch führt. Erfindungsgemäß werden vorzugsweise entweder die eigenen, für ein Signalpeptid kodierenden DNA-Sequenzen des zu exprimierenden Proteins oder die für ein Signalpeptid kodierenden DNA-Sequenzen eines milchdrüsenspezifischen Proteins verwendet. Besonders bevorzugt werden hier die Signalsequenzen des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens von Rind oder Kaninchen eingesetzt. Die Sequenz des Signalpeptides ist so mit der

für das Protein kodierenden Sequenz verknüpft, daß beim Export des Proteins aus den Milchdrüsenzellen dieses Signalpeptid exakt an der Verknüpfungsstelle abgespalten wird, so daß in der Milch das gewünschte Protein in der entsprechenden aktiven oder inaktiven Form vorliegt.

Das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt enthält ferner die genetische Information für ein zu exprimierendes heterologes Protein oder Peptid. Der Begriff "heterolog" bedeutet dabei, daß sich die kodierende DNA-Sequenz unter Kontrolle einer fremden Transkriptions-Kontrollregion befindet. Die Expression der kodierenden DNA-Sequenzen führt zur Synthese eines inaktiven Propeptides, eines reifen, aktiven Proteins und, sofern gewünscht, auch eines Fusionsproteins in der Milchdrüse. Die Wahl einer dieser Möglichkeiten kann jeweils nach den Eigenschaften und dem Verwendungszweck des exprimierten Proteins erfolgen. Milchverändernde Proteine werden bevorzugt in einer inaktiven Form exprimiert. So wird Rennin (oder Chymosin, EC 3.4.23.4) bevorzugt in der inaktiven Form Prorennin (oder Prochymosin) gebildet. Proteine, welche keine Veränderung der Milch bewirken, z.B. menschlicher IGF-I (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I) und menschliches Albumin dagegen werden bevorzugt in der reifen Form gebildet. Die Synthese eines Fusionsproteins kann z.B. von Nutzen sein, wenn der Fusionsanteil eine leichtere Reinigung des Produkts (z.B. durch Affinitätschromatographie) ermöglicht und anschließend durch eine spezifische Spaltung (z.B. chemisch oder proteolytisch) entfernt werden kann.

Als genetische Information für das entsprechende Protein kann man entweder genomische DNA-Sequenzen, die entsprechenden cDNA-Sequenzen oder eine Kombination dieser Sequenzen verwenden. Ebenso sind aber auch über Oligonukleotidsynthese hergestellte, totalsynthetische, für ein Protein kodierende Sequenzen geeignet. Die Erfindung beinhaltet weiterhin die Verwendung beliebiger Kombinationen aus genomischen DNA-Sequenzen, cDNA-Sequenzen und chemisch synthetisierten DNA-Sequenzen, die für ein Protein oder verschiedene Proteine kodieren und zu dem gewünschten Produkt führen. Vorzugsweise achtet man bei der Konstruktion synthetischer DNA-Sequenzen auf die dem Fachmann bekannte Benutzungshäufigkeit der Nukleinsäure-Codons in der zur Erzeugung transgener Tiere jeweils verwendeten Tierart.

An das Stopcodon der für das zu exprimierende Protein kodierenden DNA-Sequenz schließt sich entweder unmittelbar eine DNA-Sequenz an, welche eine Polyadenylierungsstelle und Transkriptions-Terminations-Stelle enthält, oder bevorzugt ein zweiter nicht-translatierter DNA-Sequenzbereich, der einen Exon/Intron-Übergang enthält. Vorzugsweise handelt es sich dabei um eine DNA-Sequenz, die den Exon/Intron-Übergang zwischen dem vorletzten Exon und dem letzten Intron eines Gens der Caseingen-Familie, besonders bevorzugt dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen enthält.

Diesem Exon/Intron-Übergang folgt vorzugsweise eine DNA-Sequenz, die für ein weiteres Intron kodiert. Es folgt dann darauf die DNA-Sequenz, die eine Polyadenylierungsstelle und ein Transkriptions-Terminations-Stelle enthält.

35 Polyadenylierungsstelle und Transkriptions-Terminations-Stelle der in der Erfindung verwendeten DNA-Konstrukte können dem eigenen Genbereich des zu synthetisierenden Proteins oder einem milchdrüsenspezifischen Gen entnommen werden. Vorzugsweise wird die Polyadenylierungsstelle des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens verwendet. Erfindungsgemäß können auch künstliche, chemisch synthetisierte Terminationssequenzen (z.B. beschrieben in Levitt et al 1989, Genes and Development 3: 1019-1025) verwendet werden.

40 Im Anschluß an die Polyadenylierungsstelle werden vorzugsweise in den verwendeten DNA-Konstrukten weitere nichttranskribierte und nichttranslatierte 3'-DNA-Sequenzen benutzt, welche eine Expression fördern. Diese Sequenzen stammen aus dem ursprünglichen, von dem zu synthetisierenden Protein stammenden Genbereich oder von einem milchdrüsenspezifischen Gen. Vorzugsweise wird hierzu der  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenbereich des Rindes oder des Kaninchens verwendet.

45 Erfindungsgemäß bevorzugt werden die DNA-Bereiche zu einer Expressionskassette zusammengesetzt, deren 5'- und 3'-Ende durch Anfügen von Oligonukleotiden so modifiziert ist, daß die Abtrennung dieser Expressionskassette von einem größeren DNA-Komplex durch vollständige Spaltung mit Restriktionsenzymen möglich ist, ohne daß dabei die Expressionskassette zerstört wird. Dabei verwendet man vorzugsweise Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welche eine eukaryotische DNA statistisch selten schneiden. Dadurch ist es möglich, die Expressionskassette von DNA-Bereichen abzuspalten, die zur Replikation in Bakterien befähigt sind und eine genomische Integration bei der Erzeugung transgener Tiere stören. Vorzugsweise werden solche Enzyme und ihre Schnittstellen verwendet, die 8 Basenpaare als Erkennungssequenz besitzen oder/und in ihrer Erkennungsstelle mindestens einmal, besser mehrmals, die in eukaryotischer DNA seltene Basenfolge CpG besitzen wie z.B. Sall, NotI, SacII, PvuI. So spalten Enzyme mit einer Erkennungssequenz, die zweimal die Basenfolge CpG enthält, eine eukaryotische DNA statistisch nur ca. alle 150 kb. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette kann jedes beliebige Protein in aktiver oder inaktiver Form, in reifer Form oder als Bestandteil eines Vorläufer- bzw. eines Fusionsproteins in hoher Ausbeute spezifisch in der Milch transgener Tiere gebildet werden.

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthält. Dabei ist die Art dieses Vektors beliebig, d.h. es kann ein eukaryontischer oder ein prokaryontischer Vektor sein, er kann zur Integration in ein Genom oder zur extrachromosomalen Replikation fähig sein. Alle derartige Vektoren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt. Man kann den rekombinanten Vektor zur Vermehrung der erfindungsgemäßen DNA-Konstrukte verwenden, man kann jedoch auch einen rekombinanten Vektor herstellen, der zur Integration von erfindungsgemäßen DNA-Konstrukten in die Keimbahn von Säugetieren geeignet ist, z.B. ein replikationsdefekter Retrovirus. (Übersicht: Palmiter et Brinster, (1986), Ann. Rev. Genet. 20:465-499).

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus der Milch transgener Säugetiere, wobei man ein erfindungsgemäßes rekombinantes DNA-Konstrukt oder einen rekombinanten Vektor, welcher das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt enthält, in die Keimbahn eines Tieres einbringt, wobei ein transgenes Tier entsteht, und das Protein auf übliche Weise aus der Milch des Tieres oder seiner weiblichen Nachkommen isoliert.

Für das erfindungsgemäße Verfahren ist es nicht entscheidend, auf welche Art die transgenen Tiere erzeugt werden. Bevorzugt werden die transgenen Tiere durch Mikroinjektion in den Pronukleus einer Keimzelle erzeugt. Es ist jedoch auch möglich, andere dem Fachmann bekannte Verfahren zur Herstellung transgener Tiere zu verwenden. So kann z.B. ein retroviraler Vektor konstruiert werden, der das erfindungsgemäße Konstrukt enthält, und den man dann in den Genom eines Tieres einbringen kann. Die Embryonen oder die geborenen Tiere werden auf Integration der Konstrukte überprüft. Positive, mindestens eine 20 vollständige Kopie des Expressionssystems enthaltende Tiere (Primärtiere) werden zur Aufzucht verwendet. Positive Tiere werden vermehrt und deren Nachkommen (F 1-Generation) ebenfalls auf Gehalt des Transgens überprüft. Üblicherweise wird das Transgen über die Keimbahn von den Primärtieren auf die F 1-Generation nach den Mendelschen Vererbungsregeln übertragen.

Von positiven weiblichen Primärtieren wird in der Laktationsperiode die Milch auf Gehalt des Proteins überprüft. Von positiven männlichen Tieren werden weibliche F 1-Nachkommen oder weibliche Nachkommen einer späteren Generation bezüglich der Bildung des Proteins in ihrer Milch getestet. Positive Tiere, deren Nachkommen oder die selbst in ihrer Milch die rekombinanten Proteine bilden, werden durch Vermehrung zur Aufzucht stabiler Tierlinien verwendet.

Die rekombinanten Proteine werden aus der Milch nach üblicherweise bekannten, für das jeweilige Protein geeigneten Verfahren isoliert. Erfindungsgemäß wird die Isolation der rekombinanten Proteine erleichtert durch eine geeignete Auswahl der zur Erzeugung transgener Tiere verwendeten Ei- und Samenzellen. Dieses Auswahlverfahren wird dann durchgeführt, wenn normalerweise ein endogenes, zum rekombinanten Protein homologes, Protein in der Milch vorliegt. In diesem Fall werden Keimbahnzellen zur Erzeugung transgener Tiere herangezogen, die aufgrund genetischer Bedingungen das entsprechende endogene Protein nicht in der Milch bilden. Die genetischen Bedingungen sind entweder natürlicher Art oder können durch gezielte Manipulation erreicht werden. Vorzugsweise wird daher z.B. zur Gewinnung von menschlichem Serumalbumin aus der Milch transgener Tiere eine Variante gewählt, die kein eigenes Serumalbumin bildet (Esumi et al. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:734-738; Inoue (1985), Hepatology 5:892-898).

Die Erfindung beinhaltet auch eine Auswahl von Keimbahnzellen zur Erzeugung transgener Tiere von einer Spezies, die in ihrer Milch bezüglich der Aminosäuresequenz ein zum rekombinanten Protein vollständig homologes Protein bildet. Diese Homologie kann natürlicher Art sein oder auf einer genetischen Variante beruhen. Vorzugsweise wird der reife, menschliche IGF-I in der Milch transgener Schweine und Rinder gebildet, deren endogener reifer IGF-I die identische Aminosäuresequenz besitzt.

Erfindungsgemäß ist auch die Gewinnung eines aus zwei oder mehreren Untereinheiten zusammengesetzten Proteins aus der Milch eines transgenen Tieres möglich. Dies geschieht so, daß man ein transgenes Tier verwendet, das zwei oder mehrere verschiedene erfindungsgemäße DNA-Konstrukte in seinem Genom integriert besitzt. Somit beinhaltet die Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung transgener Tiere, die zwei oder mehrere verschiedene Fremdgene in ihrem Genom integriert besitzen. Dafür existieren zwei Möglichkeiten. So kann man zwei transgene Tiere der gleichen Art, die aber jeweils ein verschiedenes Fremdgen, vorzugsweise in Form eines erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts in ihrem Genom integriert besitzen, auf übliche Weise (z.B. durch Mikroinjektion in die Keimzellen) herstellen, diese Tiere oder deren Nachkommen miteinander kreuzen und aus den Nachkommen dieser Kreuzung diejenigen transgenen Tiere auswählen, welche gleichzeitig für die verschiedenen Fremdgene beider Elterntiere positiv sind. Andererseits kann man auch ein transgenes Tier mit zwei oder mehreren Fremdgene in seinem Genom herstellen, indem man ein Fremdgen, vorzugsweise ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt in die Keimbahn eines Tieres einbringt, das bereits eines oder mehrere andere Fremdgene in seinem Genom integriert besitzt. Auf diese Weise sind transgene Tiere herstellbar, die beliebig viele aktive Fremdgene in ihrem Genom integriert

besitzen. Bei Verwendung von erfindungsgemäßen DNA-Konstrukten erfolgt eine gleichzeitige Sekretion von mehreren Proteinen oder Peptiden in die Milch, so daß sich gegebenenfalls dort ein aus zwei oder mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzter Proteinkomplex assemblieren kann.

5 Weiterhin ist somit ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Milch eines transgenen Tieres, das ein oder mehrere rekombinante erfindungsgemäße DNA-Konstrukte in seinem Genom integriert enthält.

6 Die Erfindung beinhaltet die Expression jeglicher Proteine. Dies können inaktive Vorläuferproteine, aktive reife Proteine oder Teilproteine eines größeren Proteinkomplexes sein sowie Teile eines Fusionsproteins. Allein die kodierende DNA-Sequenz bestimmt die Form des kodierenden Proteins. Bei erfindungsgemäßer Verwendung der beschriebenen DNA-Sequenzen können z.B. Human- oder Tier-Serumalbumin, 10 Urokinase, t-PA, Wachstumshormone, Interferone, Peptidhormone, Prorennin und andere Proteine gebildet werden.

15 Für die Verwendung erfindungsgemäß hergestellter Proteine besteht keine Einschränkung. Vorzugsweise werden sie im medizinischen bzw. pharmazeutischen Bereich oder in der Lebensmitteltechnik eingesetzt. Besonders geeignet ist die Verwendung für Zwecke in der Lebensmitteltechnologie, da die Begleitproteine des rekombinanten Proteins aus der Milch bei diesen Anwendungen nicht toxisch sind. Daher ist bei bestimmten rekombinanten Proteinen keine oder nur eine partielle Trennung von den Milchproteinen nötig.

20 Schließlich beinhaltet die Erfindung auch noch ein rekombinantes DNA-Konstrukt zur Herstellung einer Expressionskassette, das anstelle des DNA-Bereichs, welcher die genetische Information für ein heterologes Peptid oder ein Protein enthält, eine Klonierungsstelle zum Einbau eines derartigen DNA-Bereichs enthält. Bei dieser Klonierungsstelle kann es sich um die Schnittstelle eines Restriktionsenzym-s handeln. Vorzugsweise handelt es sich um eine singuläre Restriktionsschnittstelle, d.h. um eine Schnittstelle, die nur einmal im gesamten DNA-Konstrukt vorkommt. Besonders bevorzugt enthält diese Klonierungsstelle die Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme, wobei man günstigerweise solche Restriktionsenzyme auswählt, die im gesamten DNA-Konstrukt nur eine Schnittstelle besitzen.

25 Die folgenden Beispiele sollen zusammen mit den Abbildungen 1 bis 5 die Erfindung besser verdeutlichen.

In den Abbildungen sind Exons sowie Konstrukte zueinander nicht maßstabgerecht wiedergegeben.  
Es zeigen:

30 Abbildung 1:

$\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingebereich des Rindes mit Subklonen, siehe Beispiel 1 (die Nukleotidsequenz des Konstrukts p19 ist in Anhang 1 dargestellt).

35 Abbildung 2:

Renningebereich des Rindes mit Subklonen, s. Beispiel 2.

Für die Abbildungen 3.1 bis 3.14 bedeuten, sofern nichts anderes angegeben ist, die folgenden Symbole:

40

 = Vektorbereich

LE = Letztes nichtkodierendes Exon des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens

 =  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingebereich

 = Exon des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens

45

 = Renningebereich

 = Exon des Rennings

50 Abbildungen 3.1 bis 3.3:

Verknüpfung des Bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotors mit dem Renning, s. Beispiel 3a.

55 Abbildungen 3.4 bis 3.6:

Verknüpfung des Rennings mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor über den für das Signalpeptid des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseins kodierenden Bereich, s. Beispiel 3b.

Abbildungen 3.7 bis 3.8:

Verknüpfung des Renningens mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor, dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Signalpeptid sowie 3'-nichttranslatierten Sequenzen des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens, s. Beispiel 3c.

5

Abbildungen 3.9 bis 3.10:

Expressionssystem für menschlichen IGF-I unter Kontrolle 5'- und 3'-regulierender DNA-Sequenzen aus dem bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingengbereich.

10

Abbildung 3.11:

Entwicklung einer Expressionskassette zur Synthese von Proteinen in der Milchdrüse transgener Tiere, siehe Beispiel 3e.

15

Abbildungen 3.12 bis 3.14:

Expressionssystem für Rennin unter Kontrolle regulierender 5,- und 3'-Sequenzen aus dem bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinbereich unter Verwendung eines synthetischen Renningens, siehe Beispiel 3f (die kodierende

20 Nukleinsäuresequenz des synthetischen Renningens ist in Anhang 2a, die komplementäre Nukleinsäuresequenz in Anhang 2b dargestellt).

Beispiele

25 Methoden wurden - falls nicht besonders erwähnt - nach Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory und Ausubel et al. 1987, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons durchgeführt. Enzyme wurden von Gibco-BRL, Chemikalien von Sigma bezogen, Ausnahmen davon sind gekennzeichnet.

30 **Beispiel 1**

Klonierung und Charakterisierung des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingengbereichs des Rindes

Der  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingengbereich des Rindes wurde über eine  $\lambda$ -Genbank isoliert. Aus Rinderlymphozyten (isoliert aus Rinderblut mit Ficoll Paque von Pharmacia LKB, gemäß den Angaben des Herstellers) isolierte DNA wurde mit dem Enzym Sau3AI (New England Biolabs) partiell gespalten. DNA-Fragmente im Größenbereich von 14 bis 21 Kb wurden über einen Salzgradienten angereichert, mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) behandelt und mit dem Vektor  $\lambda$ EMBL3 (Genofit, Heidelberg; Lit.: Frischaufl et al. 1983, J. Mol. Biol. 170: 827-842) ligiert; wobei der Vektor zuvor mit den Enzymen BamHI und EcoRI gespalten worden war. Die ligierte DNA wurde in vitro mit einem  $\lambda$ -Verpackungsextrakt (Stratagene, Giga Pack Plus) gemäß den Angaben des Herstellers verpackt. Die so erhaltenen  $\lambda$ -Klonen wurden auf dem E. coli-Stamm K803 vermehrt; aus  $1 \times 10^6$  amplifizierten Klonen wurde eine Rindergenbank etabliert.  $1 \times 10^6$  Klonen der Genbank wurden parallel mit zwei Oligonukleotiden (CP4 und CP5) durchmustert. Die Oligonukleotide

45

CP4: 5'- ATC ACC TTG ATC ATC AAC CCA GCT TGC TGC TTC TTT CCA GTC TTG GGT TC .3'

50

CP5: 5'- ATG AAA CTT TCT ATC CTT ACC TGT CTT GTG GCT GTT GCT CTT GCC .3'

wurden gemäß den publizierten Sequenzen von Bonsing und Mackinlay 1987, Journal of Dairy Research 54: 447-461 (CP4: S. 451; CP5: S. 450) chemisch synthetisiert (Cyclone, Milligen-Bioscience). Sie entsprechen einem Teil des ersten, nichtkodierenden Exons (CP4) und dem für das Signalpeptid kodierenden Bereich (CP5). Positive Klonen, die mit beiden Proben hybridierten, wurden durch Subklonierungen und Spalten mit Restriktionsenzymen näher charakterisiert. Vom 5'- und vom 3'-Ende des Klons  $\lambda$ 84 wurden jeweils repetitionsfreie Fragmente (p26 bzw. p84, Abb. 1) isoliert. Mit ihnen wurde die Rindergenbank erneut durchmustert, positive Klonen wurden wie beschrieben charakterisiert. Durch Sequenzanalyse von p19 und

p86 (Abb. 1) konnte im Vergleich mit publizierten Sequenzen (Stewart et al. 1984, Nucl. Acids Res. 12: 3895-3907; Bonsing und Mackinlay 1987, Loc. cit., Yu-Lee et al. 1986, Nucl. Acids Res. 14: 1883-1902) gezeigt werden, daß sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende des Rinder  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens, sowie daran anschließende Gembereiche, isoliert worden waren. Damit waren insgesamt 40 Kb des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenbereichs (Abb. 1) isoliert worden.

### Beispiel 2

#### Klonierung des Renningens des Rindes

10 1x10<sup>6</sup> Klone der unter Beispiel 1 beschriebenen Rindergenbank wurden mit dem Oligonukleotid RN(5'-GAG GTG TCT CGT GGT GCT ACT TGC TGT CTT CGC TCT CTC CCA GGG CAC -3') durchmustert. RN wurde chemisch (Cyclone, Milligen-Bioscience) gemäß der publizierten Sequenz: Hidaka et al. 1986, Gene 43: 197-203) synthetisiert; das Oligonukleotid RN entspricht einem Teil des ersten Exons des Renningens (Position 28 - 75, Hidaka et al. 1986, loc. cit.). Von dem Klon  $\lambda$ 522 (Abb. 2), der dabei erhalten worden war, wurde am 3'-Ende ein repetitionsfreies DNA-Fragment isoliert (p6, Abb. 2), mit dem die Genbank erneut durchmustert wurde. Dabei konnte der Klon  $\lambda$ 215/1 erhalten werden (Abb. 2). Beide Klone wurden durch Subklonierungen und Spalten mit Restriktionsenzymen charakterisiert. Durch Vergleich des Musters der Schnittstellen mit dem publizierten Bereich (Hidaka et al. 1986, loc. cit.) konnte gezeigt werden, daß beide Klone einen ca. 33 Kb großen Bereich des Renningens umfassen, das vollständig in diesem Bereich enthalten ist (Abb. 2).

### Beispiel 3

#### Konstruktion von milchdrüsenspezifischen Expressionssystemen

##### a) Verknüpfung des bovinen $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotors mit dem Renningen

30 Ein mögliches Protein, das durch den beschriebenen Prozeß in der Milch transgener Tiere gewonnen werden kann, ist Rennin. Die Konstruktion wird dabei so gewählt, daß Rennin in der inaktiven Form Prorennin gebildet wird, um eine Spaltung von Milchproteinen durch das aktive Rennin zu verhindern.

35 Das im E. coli-Stamm WA321 (AB1157, dam-4; Dreiseikelmann et al. 1979, Biochim Biophys Acta 562: 418-428) vermehrte Plasmid P19 (Abb. 1) wurde zunächst mit dem Enzym EcoRI partiell gespalten, anschließend wurde mit dem Enzym BamHI der Spaltansatz vollständig gespalten. Dadurch konnte das 6,7 Kb Fragment, das an der EcoRI-Schnittstelle im Polylinker gespalten worden war, von den anderen Spaltprodukten abgetrennt werden.

40 Dieses Fragment wurde mit BclI gespalten und das 4,2 Kb Spaltprodukt isoliert (Abb. 3.1), dies entspricht der Spaltung an Position 1485 (Anhang 1) des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotors. Die verwendete Spaltstelle liegt zwischen der TATA-box und dem Transkriptionsstart des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen, das Fragment enthält den unmittelbaren Promotorbereich.

45 Zur problemlosen Kombination des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotorbereiches mit dem Renningen eignet sich die BstYI-Schnittstelle, die zwischen der TATA-Box und dem Transkriptionsbeginn des Renningens liegt und die aufgrund gleicher überhängender Enden problemlos mit der BclI-Schnittstelle neu kombiniert werden kann. Dazu wurde das Konstrukt p9 (Abb. 2), das den Promotorbereich und das erste Exon des Rennins enthält, mit HindIII und EcoRI vollständig und anschließend mit BstYI partiell gespalten. Ein ca. 2,9 Kb großes Fragment wurde isoliert und mit dem BclI/EcoRI-Fragment ligiert (Abb. 3.1). Mit dem Ligationsansatz transformierte E. coli HB101 wurden untersucht, durch Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, daß das Plasmid p33 (Abb. 3.1) auf dem 4,2 Kb insertierten Fragment die richtige Verknüpfung besaß.

50 Der Bereich von Exon 2 bis Exon 5 des Renningens wurden zu dem Konstrukt hinzugefügt, indem p33 mit EcoRI partiell und Sall vollständig gespalten (Abb. 3.2) und das 4,2 Kb Fragment isoliert wurde, das den  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenpromotorbereich mit dem Exon 1 des Renningens enthielt. Dieses Fragment wurde mit einem 7,7 Kb Fragment ligiert (Abb. 3.2), das nach vollständiger Spaltung mit Sall und partieller Spaltung mit EcoRI aus p10 (Abb. 2) erhalten worden war (Abb. 3.2). Daraus wurde das Plasmid p34 (Abb. 3.2) erhalten, das den  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor sowie Exon 1 - 5 des Renningens enthielt.

55 Um das vollständige Renningen verknüpft mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor zu erhalten, wurde zunächst das Plasmid p34 mit HindIII linearisiert (Abb. 3.3) und mit alkalischer Phosphatase behandelt

(Boehringer Mannheim). Aus dem Plasmid p15 (Abb. 2) wurde nach vollständiger Spaltung mit HindIII ein 5,5 Kb Fragment isoliert (Abb. 3.3), das Exon 6 - Exon 9 des Renningens enthielt. Das Fragment wurde mit dem linearisierten p34 ligiert, daraus konnte p42 (Abb. 3.3) erhalten werden, welches das komplette Renningens enthielt.

5 Bei Mikroinjektionsexperimenten zur Erzeugung transgener Tiere stören Plasmidanteile. Um das Expressionssystem einfach vom Vektoranteil trennen zu können, wurde p42 durch partielle Spaltung mit HindIII linearisiert und mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) behandelt. Die beiden phosphorylierten Oligonukleotide HS1 (5'- AGC TAG TCG ACT CTA GAC CGC GGT -3') und HS2 (5'- AGC TAC CGC GGT CTA GAG TCG ACT -3') wurden hybridisiert und mit dem linearisierten p42 ligiert.

10 Durch Sequenzanalyse und Sall-Spaltung konnte gezeigt werden, daß p43 (Abb. 3.3) ein Oligonukleotidpaar an der richtigen Position enthielt; durch Spaltung mit Sall ist es möglich, das insertierte Fragment des p43 vom Vektoranteil zu trennen. Nach Sall-Spaltung von p43 konnte ein 14,7 Kb Fragment isoliert werden, welches das Renningens unter Kontrolle des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotors enthält. Signalsequenz und RNA-Terminationssignal stammen vom Renningens.

15 b) Verknüpfung des Renningens mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor über den für das Signalpeptid kodierenden Bereich des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens

Nach Spaltung des Kontraktes p19 (Abb. 1) mit SacI und BgIII wurde ein 5,6 Kb Fragment isoliert und mit dem Oligonukleotidpaar CIIR1/CIIR2 ligiert (Abb. 3.4). Das Fragment enthielt den Vektoranteil von p19 sowie den  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotoranteil bis zur BgIII-Schnittstelle an Position 2898 (Anhang 1), die kurz vor Beginn des zweiten Exons des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens liegt (Position 2900, Anhang 1). Die Oligonukleotide CIIR1 und CIIR2 wurden chemisch synthetisiert (Cyclone, Milligen-Bioscience), phosphoryliert und miteinander hybridisiert. Sie enthielten die kodierende Information für das Signalpeptid des bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens verknüpft mit den Aminosäuren 1 bis 6 des bovinen Prorennins, sowie aus klonierungs-technischen Gründen weitere Sequenzen:

25

### BgIII

30

CIIR1 5' - GAT CTT GAC AAC CAT GAA ACT TCT -

CIIR2 3' - AA CTG TTG GTA CTT TGA AGA -

### $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Casein-Signalpeptid

35

- CAT CCT TAC CTG TCT TGT GGC TGT -

- GTA GGA ATG GAC AGA ACA CCG ACA -

### Prorennin

40

- TGC TCT TGC CAC TGA GAT CAC CAG -

- ACG AGA ACG GTG ACT CTA GTG GTC -

### SacI

45

- GAT CCG AGCT - 3'

- CTA GGC - 5'

50

### BamHI

55

Durch Sequenzierung wurde bestätigt, daß der Klon p73 (Abb. 3.4) die Konstruktion in der richtigen Anordnung enthielt. Die BamHI-Schnittstelle im Oligonukleotidpaar CIIR1/CIIR2 ermöglichte eine Fusion an das zweite Exon des Renningens an der Aminosäure 6 des Prorennins, wobei der Leserahmen erhalten blieb. Dazu wurde zunächst das Plasmid P10 (Abb. 2), das Exon 1 - 5 des Renningens enthielt,

mit Sall vollständig und BamHI partiell gespalten (Abb. 3.5). Ein 6,8 Kb Fragment, das den Vektoranteil von p10 sowie Exon 2 - 5 des Renningens enthielt, wurde mit einem 3 Kb Fragment ligiert, welches nach Spaltung von p73 (Abb. 3.4) mit den Enzymen BamHI und Sall erhalten worden war (Abb. 3.5).

Der Klon p75 (Abb. 3.5) enthielt Exon 2 - Exon 5 des Renningens mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor über das Signalpeptid  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseins verknüpft. Der Vektoranteil wurde von p75 nach Spalten mit Sall und HindIII entfernt (Abb. 3.6), das 7,1 Kb Fragment wurde mit einem 7,3 Kb Fragment ligiert, welches nach Spaltung von p43 (Abb. 3.3) mit HindIII (vollständig) und Sall (partiell) erhalten worden war (Abb. 3.6) und Exon 6-Exon 9 des Renningens enthält. Der daraus resultierende Klon p77 (Abb. 3.6) enthielt die genetische Information für das Prorennin, welches mit der für das Signalpeptid des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseins kodierenden Sequenz verknüpft war. Daneben enthielt p77 den  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor und das erste nichtkodierende Exon sowie das erste Intron des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens verknüpft mit der  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Casein-Signalpeptidsequenz in der natürlichen Anordnung. Terminationssignal und Polyadenylierungsstelle stammen vom Renningens. Durch Spaltung mit Sall konnte das Expressionssystem vom Vektoranteil getrennt werden.

c) Verknüpfung des Renningens mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor, dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Signalpeptid sowie 3'-nichttranslatierten Sequenzen des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens

Das Konstrukt p86 (Abb. 1) wurde mit BamHI und Sall gespalten und mit dem Oligonukleotidpaar BSI/BSII (BSI: 5'- GAT CTG GGG TCT CCT ACC ATC G -3'; BSII: 5'- TCG ACG ATG GTA GGA GAC CCC A -3') ligiert (Abb. 3.7). BSI und BSII waren chemisch synthetisiert worden (Cyclone, Millingen-Biosearch). Damit wurde die BamHI-Schnittstelle entfernt ( $\cong$  p87; Abb. 3.7). Das Konstrukt p87 wurde mit EcoRI linearisiert und mit dem Oligonukleotidpaar C3'RI/C3'RII ligiert (Abb. 3.7). Die Oligonukleotide C3'RI und C3'RII:

25	C3'RI	5' - AAT TGT CGA CGG ATC CTG GGG -
	C3'RII	3' - CA GCT GCC TAG GAC CCC -
30	C3'RI	- GAT GTT TTC ATC CGA GAG TAT -
	C3'RII	- CTA CAA AAG TAG GCT CTC ATA -
35	C3'RI	- TAC AGC GTC TTT GAC AGG GCC -
	C3'RII	- ATG TCG CAG AAA CTG TCC CGG -
40	C3'RI	- AAC AAC CTC GTG GGG CTG GCC -
	C3'RII	- TTG TTG GAG CAC CCC GAC CGG -
45	C3'RI	- AAA GCC ATC TGA GGA GTC AAG -
	C3'RII	- TTT CGG TAG ACT CCT CAG TTC -
50	C3'RI	- TG -3'
	C3'RII	- ACT TAA -5'

waren chemisch synthetisiert worden (Cyclone, Milligen-Biosearch) und enthielten den kodierenden Teil des neunten Exons 3'-seitig von der BamHI-Schnittstelle bis zum Stopkodon, daran anschließend den 3'-nichtkodierenden Bereich nach dem Stopkodon des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens bis zur EcoRI-Schnittstelle (Position 724, Stewart et al. 1984, Nucl. Acids Res. 12: 3895-3907). Durch Sequenzierung wurde bestätigt, daß der Klon p94 das Oligonukleotidpaar in der richtigen Orientierung enthielt. Das Konstrukt p94 wurde mit Sall partiell und BamHI vollständig gespalten (Abb. 3.8). Ein 6,2 Kb Fragment enthielt den Vektoranteil sowie das vollständige Insert. Dieses Fragment wurde mit einem 10,7 Kb Fragment ligiert

(Abb. 3.8), das nach Spaltung von p77 (Abb. 3.6) mit Sall (vollständig) und BamHI (partiell) erhalten wurde (Abb. 3.8). Dieses Fragment enthielt das vollständige Expressionssystem des p77 mit Ausnahme des 3'-Anteils nach der BamHI-Schnittstelle im neunten Exon des Renningens. Das Konstrukt p99 (Abb. 3.8) enthielt nun ein Expressionssystem, das dem von p77 (s. Beispiel 3b) entsprach, bei dem jedoch der 3'-Bereich des Renningens unmittelbar nach dem Stopkodon ersetzt durch den unmittelbar an das Stopkodon des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens anschließenden DNA-Bereich worden war. Dieser Bereich enthält neben einem Intron ein Exon, das die Signale für die Termination der Transkription und für die Polyadenylierung enthielt. Auf diese Weise wurde eine Expressionskassette konstruiert, die 5'- und 3'-regulierende Sequenzen aus dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenbereich sowie für Prorennin kodierende Sequenzen enthält. Sie kann durch Sall-Spaltung des Plasmids p99 vom Vektoranteil getrennt werden.

5 d) Expressionssystem für menschlichen IGF-I unter Kontrolle 5'- und 3'-regulierender DNA-Sequenzen aus dem bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenbereich

10 Das Konstrukt p19 (Abb. 1) wurde mit EcoRI partiell und BgIII vollständig gespalten (Abb. 3.9). Ein 5,6 Kb Fragment wurde isoliert, das den  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotorbereich, das erste nichtkodierende Exon sowie Intron A bis Position 2898 (Anhang 1) enthielt. Mit diesem Fragment wurde ein anderes DNA-Fragment ligiert, das aus den 6 Oligonukleotiden IF1 - IF6 bestand, die chemisch synthetisiert worden waren (Cyclone, Milligen-Bioscience).

15 Dazu waren zunächst die Oligonukleotide IF1 und IF2, IF3 und IF4 sowie IF5 und IF6 getrennt hybridisiert worden. Die Hybridisierungsansätze wurden zusammengegeben und ligiert (Abb. 3.10 a), bevor sie mit dem aus p19 isolierten Fragment (s.o.) ligiert wurden (Abb. 3.9). Die Oligonukleotide IF1 - IF6 enthalten die Information ab Position 2899 (Anhang 1) des bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens bis zum Ende des für das Signalpeptid kodierenden Bereichs (Position 2956). Direkt daran schließt im Leserahmen ein DNA-Bereich an, der die Information für das reife menschliche IGF-1 trägt (Aminosäuresequenz: Tavekko et al. 1988, Mol. Endo. 2: 648-681). Die Nukleinsäure-Kodons wurden nach der Benutzungshäufigkeit im Kaninchen ausgewählt (nach einer Methode von R. Lathe 1985, J. Mol. Biol. 183: 1-12). An diesen Bereich anschließend folgt ein Stopkodon, der 3'-nichttranslatierte Bereich des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens (siehe Beispiel 3c) bis zur EcoRI-Schnittstelle an Position 724 (Stewart et al. 1984, Nucl. Acids Res. 12: 3895-3907) sowie weitere, für den Klonierungsvorgang wichtige Sequenzen (Abb. 3.10b).

20 Durch Sequenzierung wurde bestätigt, daß der Klon p98 (Abb. 3.9) die korrekte Information enthielt. Das Konstrukt p98 wurde mit EcoRI partiell und BamHI vollständig gespalten. Das isolierte 5,9 Kb Fragment, das den Vektoranteil sowie das Insert von p98 enthielt, wurde mit dem 3,5 Kb EcoRI/BamHI Fragment aus p86 (Abb. 1) ligiert (Abb. 3.9).

25 Das Konstrukt p100 wurde durch Restriktionsschnitt charakterisiert, es enthielt die IGF-I Expressionskassette in der korrekten Orientierung. Die IGF-I-Expressionskassette benutzt zur Steigerung der Expression die Spleißstellen des ersten und des letzten Introns des bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens sowie diese Introns selbst. In der Expressionskassette ist die für das reife IGF-I kodierende Sequenz über die Signalsequenz des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseins mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotorbereich und dem ersten Intron des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens verbunden. Im Anschluß an das Stopkodon folgt eine 3,5 Kb 3'-Sequenz des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens, welche die DNA-Sequenz ab dem Stopkodon des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens, das letzte Intron sowie das letzte, nichttranslatierte Exon des bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens und weitere nichttranslatierte 3'-Sequenzen enthält. In diesem Exon sind die Signale für die Polyadenylierung enthalten. Die Expressionskassette kann vom Vektoranteil nach Sall-Spaltung abgetrennt werden.

30 e) Entwicklung einer Expressionskassette zur Synthese von Proteinen in der Milchdrüse transgener Tiere

35 Das Konstrukt p100 (Abb. 3.9) wurde mit EcoRI partiell und mit BgIII vollständig gespalten (Abb. 3.11). Das linearisierte 9,1 Kb große Fragment wurde mit dem hybridisierten Oligonukleotidpaar BgEI/BgEII ligiert. Die zueinander komplementären Oligonukleotide BgEI (5'- GAT CTA GAC TAG GGT AAG GGT TGC TG -3') und BgEII (5'- AAT TCA GCA ACC CTT ACC CTA GTC TA -3') waren chemisch synthetisiert worden (Cyclone, Milligen-Bioscience). Das daraus resultierende Konstrukt p115 (Abb. 3.11) enthielt das Oligonukleotidpaar. Durch partielle Spaltung von p115 mit EcoRI und nachfolgender Spaltung mit BgIII konnte ein 9,1 Kb Fragment isoliert werden, das 5'- und 3'-Anteile des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenbereichs enthielt. Über die BgIII- und EcoRI-Schnittstellen können beliebige, für Proteine kodierende DNA-Fragmente mit dem aus p115 isolierten Fragment verknüpft werden und zur Expression in der Milchdrüse transgener Tiere verwendet werden (s. nachfolgendes Beispiel).

40 f) Expressionssystem für Rennin unter Kontrolle regulierender 5'- und 3'-Sequenzen aus dem bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenbereich unter Verwendung eines synthetischen Renningens

45 Aus 26 Oligonukleotiden wurde ein synthetisches Renning gebildet, das die Information für die Bildung des Prorenning verknüpft mit dem Signalpeptid bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseins enthielt. Die DNA-Sequenz des Prorennins wurde gemäß der Aminosäuresequenz (Hidaka et al. 1986, Loc. cit.) gewählt.

Vorzugsweise wurden die natürlichen Kodons verwendet, aus klonierungstechnischen Gründen wurden jedoch Enzynmschnittstellen hinzugefügt oder deletiert. Folgende Oligonukleotide wurden nach der Sequenz des kodierenden Stranges (Anhang 2a) gebildet:

5

	Nummer	Position	
		5' - 3'	
10	R01	5 - 99	
	R03	100 - 210	
	R05	211 - 315	
15	R07	316 - 416	
	R09	417 - 518	+ 5' - GGG AGCT - 3'
	R11	519 - 609	
20	R13	610 - 699	
	R15	700 - 789	
	R17	790 - 872	
	R19	873 - 949	
25	R21	950 - 1034	
	R23	1035 - 1119	
	R25	1120 - 1209	

30

Nach der Sequenz des dazu komplementären Stranges (Anhang 2b) wurden die folgenden Oligonukleotide synthetisiert:

35

	Nummer	Position	
		5' - 3'	
40	R02	1100 - 1210	
	R04	989 - 1099	
	R06	900 - 988	
	R08	807 - 899	
45	R10	690 - 806	
	R12	614 - 692	
	R14	524 - 613	
50	R16	434 - 523	
	R18	339 - 433	
	R20	250 - 338	
55	R22	165 - 249	
	R24	80 - 164	
	R26	6 - 79	

Das gesamte Renninkonstrukt wurde aus 4 Blöcken zusammengesetzt. Jeder Block bestand aus mehreren Paaren zueinander komplementärer Oligonukleotide (z.B. Block II: R07/R08 und R09/R10), die zunächst in getrennten Ansätzen hybridisiert wurden, bevor die Oligonukleotidpaare eines Blockes miteinander ligiert und kloniert wurden. Die Blöcke bestanden aus den folgenden Oligonukleotiden (Abb. 3.12): Block I: R01 - R06; Block II: R07 - R10; Block III: R11 - R18 und Block IV: R19 - R26.

Der Klonierungsvorgang ist schematisch in Abb. 3.13 dargestellt, sämtliche Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Block I wurde über PstI- und KpnI-Schnittstellen in den Vektor pUC18 kloniert. Das daraus resultierende Konstrukt p110 wurde mit KpnI und SacI linearisiert und mit Block II ligiert. Das resultierende Konstrukt p111 enthielt die Blöcke I und II ( $\triangleq$  R01 - R10). Block IV wurde in einen mit EcoRV und KpnI linearisierten Bluescript-Vektor (Fa. Stratagene) kloniert. Das daraus resultierende Konstrukt p112 wurde mit SmaI und EcoRV linearisiert und mit Block III ligiert. Das Konstrukt p113 enthielt die Blöcke III und IV ( $\triangleq$  R11 - R26). Das resultierende Konstrukt p111 wurde mit SmaI und SacI linearisiert und mit einem Fragment ligiert, das nach Spaltung von p113 mit SmaI und SacI erhalten wurde und den ligierten Blöcken III und IV entsprach. Das Konstrukt p114 enthielt die gesamte, für das  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinsignalpeptid und Prorennin kodierende genetische Information.

Um diese genetische Konstruktion in die Expressionskassette P115 einzusetzen, wurde p115 mit EcoRI partiell und mit BglII vollständig gespalten. (Abb. 3.14). Das linearisierte 9,1 Kb große Fragment wurde mit dem 1,2 Kb Fragment ligiert, das nach Spaltung des Konstruktes p114 mit den Enzymen BglII und EcoRI erhalten wurde und die genetische Information für das Prorennin verknüpft mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinsignalpeptid enthielt. Das Konstrukt p116 (Abb. 3.14) enthielt das synthetische Renningen verknüpft mit dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Signalpeptid unter Kontrolle 5'- und 3'-regulierender Sequenzen aus dem bovinen  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingenbereich. Nach Spaltung mit Sall konnte das Expressionssystem vom Vektoranteil getrennt werden.

#### 25 Beispiel 4

##### Erstellung transgener Säugetiere

Die Erstellung transgener Säugetiere umfaßt die Herstellung injizierbarer DNA-Lösung, die Gewinnung befruchteter Eizellen und Embryonen, die Mikroinjektion der DNA-Lösung in Vorkerne oder Kerne, den Transfer der injizierten Zygoten auf synchronisierte Empfängertiere und die Untersuchung der geborenen Tiere auf Integration. Dabei sind für die einzelnen Säugerspezies wie Kaninchen oder Rind einige speziesbedingte Unterschiede bei der Vorbereitung der Spender- und Empfängertiere, der Gewinnung und dem Transfer der Embryonen sowie der Mikroinjektion zu beachten.

##### 35 a) Herstellung einer injizierbaren DNA-Lösung

Von Vektormolekülen abgetrennte DNA-Fragmente (über Gelelektrophorese), welche die vollständigen Expressionskonstrukte enthielten, wurden in steril filtriertem TE-Puffer (10 mM Tris, 0,2 mM EDTA, pH 7,6) zu einer Konzentration von 1000 Kopien pro Picoliter aufgenommen und für die Mikroinjektion verwendet.

##### 40 b) Gewinnung von Embryonen aus Kaninchen

Geschlechtsreife Spenderkaninchen erhalten zur Superovulation eine einmalige Gabe von 10 bis 40 IE PMSG (Pregnant Mares' Serum Gonadotropin) pro kg Körpergewicht. Dieser Superovulation ging eine 21tägige Einzelhaltung oder eine Vorsynchronisation mit 120 IE HCG (Human Chorionic Gonadotropin) voraus. 72 bis 76 Stunden nach der PMSG-Injektion werden die Kaninchen zweimal im Abstand von einer Stunde künstlich besamt oder im Natursprung belegt. Unmittelbar danach erhalten sie zur Ovulationsinduktion 120 bis 180 IE HCG i.v.. Die Embryogewinnung erfolgt 19 bis 21 Stunden nach der Belegung durch Schlachttötung der Spenderkaninchen. Die Eileiter werden mit Kulturmedium für Kaninchenembryonen (BSM II + 20% FKS oder PBS + 20% FKS) durch Spülung vom Fimbrientrichter in Richtung Uterushornende gewonnen. Falls erforderlich, wird der noch vorhandene Cumulus Oophorus durch Hyaluronidase-Behandlung entfernt. Die Embryonen werden gewaschen und bis zur Mikroinjektion kultiviert.

##### 50 c) Gewinnung von Embryonen aus Rindern

Rinder und Kühe werden nach gynäkologischer Untersuchung unabhängig vom Zyklusstand durch zweimalige PG-Applikation (PG-F2  $\alpha$ -Analog Estrumate, 500 mg Cloprostenol-Natriumsalz, i.m.) im Abstand von 12 Tagen synchronisiert. 48 bis 72 Stunden später sind die Tiere dann im Brunst. 11 bis 14 Tage nach dieser Brunst erhalten die Tiere morgens um 6 Uhr 2000 bis 3000 I.E. PMSG i.m. und nach 60 Stunden eine weitere PG-Applikation. Zwei Tage später kommen die Tiere in Brunst und werden um 18.00 Uhr besamt. Am darauffolgenden Tag um 6.00 Uhr erfolgt die zweite Besamung. Einen Tag später

erfolgt zwischen 7.00 und 9.00 Uhr nach Schlachtung der Spendertiere die Gewinnung der Genitalorgane. Dazu wird nach dem Betäubungsschuß während des Ausblutens kranial des Euters ein etwa zwei handbreiter Schnitt in der Linie alba gesetzt und die Bauchhöhle geöffnet. Zervix und Gebärmutter mit Eileitern und Eierstöcken werden entnommen. Die Eileiter werden von den Eierstöcken freipräpariert und am uterotubalen Übergang abgetrennt. Eine 2,5 mm dicke Knopfkanüle wird in das Infundibulum eingeführt und fixiert. Der Eileiter wird mit etwa 20 ml PBS (Phosphat Buffer Saline) mit 20 % FCS (Fetal Calf Serum) durchgespült. Die in einer Petrischale aufgefangene Spülflüssigkeit wird unter dem Mikroskop nach Eizellen abgesucht. Die gefundenen Eizellen werden gewaschen, in Embryogläser verpackt und ins Labor transportiert.

10 d) Mikroinjektion der DNA-Lösung

Für die Mikroinjektion werden ein Inversmikroskop (Zeiss, ICM 405) zwei Leitz-Mikromanipulatoren und ein Injektionsgerät (Eppendorf) verwendet. Der eine Manipulator trägt eine Haltepipette, mit der der Embryo durch Unterdruck fixiert werden kann. Auf dem zweiten Mikromanipulator wird die mit DNA-Lösung gefüllte Injektionspipette in einem Nanostepper fixiert und mit dem Injektionsgerät verbunden. Die Spitze der Injektionspipette hat einen Durchmesser von 1 bis 2  $\mu\text{m}$ . Zur Mikroinjektion wird die Pipettenspitze durch die Zona Pellucida, die Zellmembran und die Kernmembran in das Kernlumen vorgeschoben und ca. 1 bis 2 pl DNA-Lösung werden dort abgesetzt. Die Volumenzunahme des Vorkerns signalisiert eine erfolgreiche Mikroinjektion. Z. T. erfolgt auch eine Mikroinjektion der Kerne von Embryonen im Zweizellstadium. Die Mikroinjektion erfolgt in einem Mediumtropfen auf einem Deckglas oder in einer sogenannten Injektionskammer. Nach der Mikroinjektion werden die Eizellen oder Embryonen bis zum Transfer kultiviert.

In Rindereizellen und in -embryonen sind aufgrund der dunklen lipidhaltigen Granula keinerlei Kernstrukturen erkennbar. Durch Zentrifugation der Eizellen bzw. Embryonen in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 15.000 g für ca. 3 Minuten können die Kerne sichtbar gemacht werden.

25 e) Kultur und Transfer der mikroinjizierten Eizellen und Embryonen bei Kaninchen

Empfängerkaninchen werden 21 Tage vor dem voraussichtlichen Termin zur Zyklussynchronisation einzeln aufgestellt und erhalten zur Induktion einer Pseudogravität 120 IE HCG. Am Tag vor dem Transfer erhalten die Empfängerkaninchen zur Ovulationsinduktion 120 IE HCG i.v. Zum Transfer werden die Kaninchen mit 0,4 ml Rompun 2 % pro kg/Körpergewicht und 0,8 ml Ketamin 10% pro kg/Körpergewicht narkotisiert. Nach Vorbereitung des Operationsfeldes und Entleerung der Harnblase durch transabdominalen Druck werden die Kaninchen in Rückenlage ausgebunden und in Schräglage fixiert. Unmittelbar kaudal des Nabels wird die Bauchhöhle in einer Länge von ca. 4 bis 5 cm geöffnet. Ovar, Eileiter und kraniales Uterushorn werden vorgelagert und nach Kontrolle der Ovarreaktion werden die mikroinjizierten Embryonen mit Hilfe einer Transferpipette ca. 2 bis 2,50 cm tief in die Eileiterampulle transferiert. Pro Seite werden zwischen 8 und 15 Embryonen transferiert. Nach Verschluß der Bauchhöhle wird die Operationswunde durch eine Hautfaltendecknaht geschützt. Die Geburt der Jungtiere erfolgt 29 bis 31 Tage nach dem Transfer.

## f) Kultur und Transfer der mikroinjizierten Eizellen und Embryonen bei Rindern

### - in vitro Kultur

40 Die Kultur der mikroinjizierten Zygoten wird in vitro durchgeführt. Für diese in vitro Kultur werden Granulosazellen aus dem Kumulus oder Epithelzellen aus dem Eileiter mit den Embryonen kokultiviert. Als Medium verwenden wir das modifizierte Parker Medium TCM 199. Von entscheidender Bedeutung ist, daß die Kultur in einer Gasatmosphäre mit reduziertem Sauerstoffgehalt (5 % O<sub>2</sub>) und bei 5 % CO<sub>2</sub> in 90% Stickstoff erfolgt. Die Kultur wird bei 39 °C und maximaler Luftfeuchtigkeit durchgeführt. In 6 45 Tagen entwickeln sich die injizierten Eizellen in der in vitro Kultur bis zu Morula-/Blastozystenstadien, die für den unblutigen Transfer geeignet sind.

#### - Transfer auf Empfängertiere

50 Die Empfängertiere erhalten gleichzeitig mit den Spendertieren am Tag 2 eine PGF2-Injektion zur Zyklussynchronisation. Eine Sedierung der Empfängertiere (6,8 mg Acepromazinmaleat pro 100 kg Körpergewicht) und eine kleine Epiduralanästhesie (Lidocain 2%ig) erleichtert die Durchführung der Embryoübertragung. Der unblutige Transfer wird mit Hilfe eines sterilen Transfergerätes (Firma Wöhrlein) vorgenommen, wobei der Embryo möglichst tief in das ipsilaterale Uterushorn übertragen wird. Nach dem Transfer erhalten die Empfänger Clenbuterolhydrochlorid als Uterusrelaxans. Fünf bis sechs Wochen nach dem Transfer können die Empfängertiere durch rektale Palpation auf Trächtigkeit untersucht werden.  
55

### Beispiel 5

## Untersuchung der Integration von Konstrukten im Kaninchengenom nach Mikroinjektionsexperimenten

Von Kaninchen, die z.B. mit dem Konstrukt p77 (Beispiel 3b) gemäß Beispiel 4 erzeugt worden waren, wurden zur Untersuchung Gewebeproben (meist Schwanz) verwendet. 20 µg der aus dem Gewebe isolierten DNA wurden mit 100 U EcoRI gespalten und zusammen mit einer DNA-Probe eines negativen Kaninchens einer Gelelektrophorese unterzogen. Die über ein Agarosegel aufgetrennten Fragmente wurden mit einer Vacu-Blot-Apparatur (Pharmacia - LKB) über Nitrocellulosefilter (Schleicher + Schuell, BA85) übertragen und mit radioaktiv markierten p26 (Abb. 1) hybridisiert. Das transgene Kaninchen # 2848 konnte dadurch leicht identifiziert werden

10 **Beispiel 6**

## Untersuchung der Integration von Konstrukten im Rinderchromosom nach Mikroinjektionsexperimenten

15 Die Untersuchung wurde analog Beispiel 5 durchgeführt, jedoch wurde zur Hybridisierung der Filter eine radioaktive Probe verwendet, die frei von Repitionen war und aus dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseinpromotor entnommen war ( $\cong$  p26, Abb. 1). Durch Analyse der Fragmentgrößen konnte das endogene hybridisierende Fragment von dem des Transgens unterschieden werden.

20 **Beispiel 7**

## Analyse der Nachkommen transgener Tiere

Die Analyse wurde durch Southern-Blot-Experimente wie unter Beispiel 5 durchgeführt. Zur Kontrolle 25 wurde auch DNA aus negativen Kaninchen und dem transgenen Elterntier (# 2848, s. Beispiel 5) untersucht. Anhand des Restriktionsspaltmusters wären etwaige genetische Umlagerungen zu erkennen gewesen, die jedoch nicht auftraten.

**Beispiel 8**

30 Untersuchung der Milch transgener laktierender Kaninchen, die mit Konstrukt p43 erzeugt wurden

## a) Rennin-Aktivitätstest

35 0,5 ml Milch eines transgenen laktierenden Kaninchens, das mit p43 (siehe Beispiel 3a) erzeugt worden war, wurden mit 0,5 ml Ca-Aacetat-Puffer (10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaAc, pH 6) und 20 Minuten bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Fettphase abpipettiert und verworfen. Die restliche Suspension (ca. 0,8 ml) wurde mit HCl auf pH 2,5 eingestellt und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (RT, 5 min, 13000 g). Die autokatalytische Aktivierung des Rennins wurde 90 Minuten bei 30 °C durchgeführt. Anschließend wurde mit NaOH der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Der erneut entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (RT, 5 min, 13000 g) und verworfen. 0,5 ml der klaren Lösung wurden mit 0,5 ml käuflicher Vollmilch (pasteurisiert) vermischt und bei 30 °C inkubiert und die Zeit bis zum Beginn der Gerinnung bestimmt.

So behandelte Milch transgener Kaninchen zeigte Gerinnungsaktivität im Gegensatz zu ebenso behandelter Milch negativer Kontrolltiere.

45 b) Immunnachweis von Prorennin und Rennin in der Milch transgener Tiere, welche mit dem Konstrukt p43 erzeugt wurden

Nach a) behandelte Milchproben sowie unbehandelte Proben, denen das Fett entnommen worden war (4 °C, 10 min, 3000 g), wurden auf denaturierenden PAA-Gelen aufgetrennt. (s. Ausubel et al. 1987, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Punkt 10.2.1). Die Proteine wurden anschließend mit einem Elektroblotgerät (Pharmacia - LKB) auf Nitrocellulosefilter (BA85, Schleicher + Schuell) übertragen. Transferiertes Prorennin und Rennin wurden mit polyclonalen Antikörpern detektiert, die nach Immunisierung von Kaninchen mit Rennin (Sigma) gewonnen worden waren. Als Detektionssystem wurde an Protein A gekoppelte Horse-radish Peroxidase (Amersham) verwendet. (Transfer und Immunodetektion: Ausubel et al. 1987, loc cit, Punkte 10.8.1 - 10.8.4).

55 Transgene Tiere enthielten 0,2 bis 0,6 mg/ml Prorennin in ihrer Milch. Laktierende Nachkommen, die ebenfalls das Konstrukt p43 in ihrem Genom enthielten, produzierten vergleichbare Mengen Prorennin.

**Beispiel 9**

Untersuchung der Milch transgener laktierender Kaninchen, die mit Konstrukt p77 (Beispiel 3 b) erzeugt wurden.

5 a) Rennin-Aktivitätstest  
Der Test wurde analog Beispiel 8 a) durchgeführt. Eine Gerinnungsaktivität konnte ebenfalls nur mit der Milch transgener Tiere erzielt werden.

10 b) Immunnachweis von Prorennin und Rennin in der Milch transgener Tiere, welche mit dem Konstrukt p77 erzeugt wurden  
Der Nachweis verlief analog Beispiel 8 b).  
Transgene Tiere enthielten 1 bis 4 mg/ml Prorennin in ihrer Milch. Laktierende Nachkommen, die ebenfalls das Konstrukt p77 in ihrem Genom enthielten, produzierten vergleichbare Mengen Prorennin.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

## Anhang 1

5

	10	20	30	40	50
	5' GATCTTCCCA	ATCCAGATAT	TGAACCTGCA	TCTCTAATGT	TTCCTGCATT
	60	70	80	90	100
10	GGCAGGCAGG	TTCTTTACCA	CTAGTGCCAC	CTGGAAAGTC	CGGATACACT
	110	120	130	140	150
	CCTGGGAAAG	ACAAAAGTAG	AGTATTACAA	TGCAGCAAGG	ATTTTTGTTG
	160	170	180	190	200
	TCAGCTCCTT	GAATAAAATTA	TAGTGAATAG	AAAACATTAG	TATCTTGTG
	210	220	230	240	250
15	AAATTGATGT	GAAACAGATA	GTAAGGAAGA	TAATATCTAA	AGAAAACCTTC
	260	270	280	290	300
	AATATGGGAA	ATTATAGTCT	TTTCTATCTT	CAAAGTGGAC	AGCCTGAACA
	310	320	330	340	350
	GTTTGAAAT	TTCTTTAAT	ACAAAATAAT	GTTCCCTGTCA	TACAACGTG
20	360	370	380	390	400
	AATAACACTGA	AAATATCACT	ATAGATTTT	TAAAGTATAT	AATATGATTC
	410	420	430	440	450
	CTTTCTTATA	AACAATGAGT	TGCAATCAAC	AAGTTTTAA	AGCTCTCACT
	460	470	480	490	500
	TGTATAGATT	TATTTTTAGC	ACATAATATT	TTTCTACAAAT	GTACAATTCC
25	510	520	530	540	550
	AGTTAATTCT	AGGAGTACAA	TTAAGAATTG	GAGAGATAGG	AATTTTTTC
	560	570	580	590	600
	TTTTACTTGT	TTACTTTAAA	AGATGGAAAA	TCAGAGTTAT	GGTTTATTTC
	610	620	630	640	650
	TCGCAATATT	TAAAAATTAT	AATTCTTGAA	TAACTATTAA	TTTTAATTAA
30	660	670	680	690	700
	ATAATCTGTA	ATGAGAATCC	TCCTACCAAT	GTAGGAGACG	TGAGTTTGAC
	710	720	730	740	750
	TCCCCGGTAG	GGAAGATACC	CTGCAGAAGG	AAATGGCAAC	CCACTCCAAT
	760	770	780	790	800
35	ATTATTACTT	GGGAAATCCC	ATGGACAGAG	GAGACTGGCA	GGCTGCAGTC
	810	820	830	840	850
	CATGGGGGTC	ACAAAGAACT	GGACACGACT	TAGAAACTAA	ACAACAACAA
	860	870	880	890	900
	TTTATACCA	AATGAATGAA	CTAGTTACCA	CAACTAGTAC	ACCCAAAATG
	910	920	930	940	950
40	AACAAAAAAAT	AGCTTGGTGG	TATAATTAAA	ATGCCACCAA	AATTATACAA
	960	970	980	990	1000
	ATAATTATAT	TTTCTTTTTG	CAGGAAAAAG	ATTAGACCAAC	ATATAATGTA
	1010	1020	1030	1040	1050
	ACTTATTTC	CAAGGTAAAT	AATTATAATA	AATAATATGG	ATTAACGTGAG
45	1060	1070	1080	1090	1100
	TTTTAAAAGG	TGAAATAAAAT	AATGAATTCT	TCTCATGGTC	TTGTATGTTA
	1110	1120	1130	1140	1150
	ATAAAAATTG	AAAAATTTC	AAGACCCCAT	TTTGTCCCAA	GAATTTTCATT
	1160	1170	1180	1190	1200
	TACAGGTATT	GAATTTTC	AAGGTTACAA	AGGAAATTTC	ATTGATATAA
50	1210	1220	1230	1240	1250
	TAAATGCATG	TTCTCATTAAT	AACCATAAAT	CTAGGGTTTT	GTTGGGGTTT
	1260	1270	1280	1290	1300
	TTTTTGTG	TTAATTAGA	ACAATGCCAT	TCCATTTCCT	GTATAATGAG
	1310	1320	1330	1340	1350
55	TCACCTCTT	GTTGTAAACT	CTCCTTAGAA	TTTCTGGGA	GAGGAACGTGA

	1360	1370	1380	1390	1400
	ACAGAACATT	GATTTCCATAT	GTGAGAGAAT	TCTTAGAATT	TAAATAAACC
5	1410	1420	1430	1440	1450
	TGTTGGTTAA	ACTGAAACCA	CAAAATTAGC	ATTTTACTAA	TCAGTAGGTT
	1460	1470	1480	1490	1500
	TAAATAGCTT	GGAAGCAAAA	GTCTGCCATC	ACCTTGATCA	TCAACCCAGC
	1510	1520	1530	1540	1550
10	TTGCTGCTTC	TTCCCAGTCT	TGGGTTCAAG	GTATTATGTA	TACATATAAC
	1560	1570	1580	1590	1600
	AAAATTTCTA	TGATTTTCCT	CTGTCTCATC	TTTCATTCTT	CACTAATACG
	1610	1620	1630	1640	1650
	CAGTTGTAAC	TTTTCTATGT	GATTGCAAGT	ATTGGTACTT	TCCTATGATA
	1660	1670	1680	1690	1700
15	TACTGTTAAA	AATATATTG	CAAATGTTGA	TACTATCTAT	CTCAGAGCTA
	1710	1720	1730	1740	1750
	TAGGTGAAAA	ATTAAATACT	TTTATAAAAGA	CCAAATTGAT	CATTTTTAAA
	1760	1770	1780	1790	1800
20	CGAAATTCTT	ATATACTGAA	AATGTAGATA	CATAACTTCA	GTATAGATTT
	1810	1820	1830	1840	1850
	ATGGTAAAAT	AATTTGAATC	ATTTTTGTCA	AATTCTGTAA	AAAGTTGTCA
	1860	1870	1880	1890	1900
	TACAGAATAA	TTTATAATAT	TTTGTTTTC	ATAGAAATAA	CATTTCTGGT
	1910	1920	1930	1940	1950
25	AGAATATTC	AAGGCCATT	TTATTTTG	TAATTAGGTT	AATAAAATTA
	1960	1970	1980	1990	2000
	ATTTTATAAA	GGAAATGTCA	ATGATAGACA	ATTAGATATA	AATGACTACT
	2010	2020	2030	2040	2050
30	TTTATAAAAGA	TGATTAAATT	TGGATATTG	TAAGGATACA	AATATATGAA
	2060	2070	2080	2090	2100
	AACAGTAGAC	TCATTTGGGG	CCTATAAAATA	TGTCTTTTTT	AACAAATGCA
	2110	2120	2130	2140	2150
	GGTAGATTCT	ACAGTTGTA	AACTGAAGCA	GCCTATATAA	AATAATCTGT
	2160	2170	2180	2190	2200
35	CATTAGTTG	CTGACTAAGG	TATAAACCT	TCATGTATAA	TCTAATTTTT
	2210	2220	2230	2240	2250
	CTTATGTATC	TGAAACGCAT	TTTCCAGCA	CATATAATGT	AGTATTTTG
	2260	2270	2280	2290	2300
40	GGTCTTGC	TTAATGGAA	CTCTAGGAGT	CAAACGTGAT	ATGTTGACT
	2310	2320	2330	2340	2350
	TATGATTCTG	TTAATCATC	TTCATTCA	CATGTCATGG	ATATATCAAC
	2360	2370	2380	2390	2400
	CCAGCAAAAT	TAAGTAATAG	CTAGATCCTT	TTAAAAAATT	AATGAAGGTT
	2410	2420	2430	2440	2450
45	AATAGTTCT	ACATAATGCA	CAATGTTTT	CATGAAGACT	CTGAAAGAGC
	2460	2470	2480	2490	2500
	AGGCTAAAGG	ATAAAGACAT	TTTAAAAAAAT	TACAGATATT	AAATGTAATT
	2510	2520	2530	2540	2550
50	TACCAAGTGGG	TTTTAGTTA	TCAATTAA	CAAATCCAAT	GATCTAAGAG
	2560	2570	2580	2590	2600
	GAAATTCTT	TTTAATTTT	TTTGTAGTAT	TTTAAAAATT	GTAATATTTA
	2610	2620	2630	2640	2650
	AATATTGATG	CTTCTCTATT	CCTCTGACAA	AACCCTACTA	TTACTTTCA
	2660	2670	2680	2690	2700
55	GATCAAATGC	TTTACTTTAA	AGTGTAGTAA	GATATTGGTA	TTTCTTATCT

	2710	2720	2730	2740	2750
5	TATATAAGCA	CTAAGCAAAA	TAATTTGAAT	GGTAAATATT	TATATTGAAG
	2760	2770	2780	2790	2800
	AGCAAAATTA	AAAACAAAT	GAATAAAAAT	ATTACTTTCA	AGTGCACAA
	2810	2820	2830	2840	2850
	CTTTTATCAT	AATATACTCC	TTTGTGGAA	AAATTAAGAA	TTTTTTTTTC
	2860	2870	2880	2890	2900
10	ATGAATCAAA	TTTTATTATA	AGACCTAACT	ATTTTATTTT	CTTACATAGA
	2910	2920	2930	2940	2950
	TCTTGACAAAC	CATGAAACCTT	CTCATCCTTA	CCTGTCTTGT	GGCTGTTGCT
	2960	2970	2980	2990	3000
	CTTGCCAGGC	CTGTGAGTAC	AGTAGAGAAT	TTAGAAGAGATT	CTAGATTCTT
15	3010	3020	3030	3040	3050
	GTAAAGTC	ATCTCAAATG	CAATTTGATG	CAAGTCTCAT	CAAGTGCAAG
	3060	3070	3080	3090	3100
	ATATTGTAGT	CATAAAGAAT	TTGATGGTCT	CTAATTAGCT	ATTAAAGTGT
	3110	3120	3130	3140	3150
20	TGATATTAAA	GCTATGGTAA	TCCTTCACAT	TTTGATCATT	ATTATTAGT
	3160	3170	3180	3190	3200
	TTATTCAAAG	ACTTAACACT	AAATAAAAATT	TCTAACTTGA	AATATAAACAA
	3210	3220	3230	3240	3250
	CCTCACAAATT	AAAAATTAA	AAAAAAAAGA	AATAAGGTAA	TTAACAAATAC
25	3260	3270	3280	3290	3300
	AATAAAAGAGC	ATCAAAGAAAG	GTAACTAGTC	TCTTGCCTG	GGTCCATTAT
	3310	3320	3330	3340	3350
	AGGCTTAACA	TATTTGTAAA	CATATATATA	TCCAATATTG	TATTACCAAA
	3360	3370	3380	3390	3400
30	TATACTGCTG	CTGCTGCTAA	GTCACTTCAG	TCGTTGCTGA	CTCTGTGCGA
	3410	3420	3430	3440	3450
	CACCATTGAT	GGCAGCCCCAC	ACAGCTCTGC	CATCCCTGGG	ATTCTCCAGG
	3460	3470	3480	3490	3500
	CAAGAACACT	GGAGTGGGTT	GCCATTTCCT	TCTCCAATGC	ATGAAAGTGA
35	3510	3520	3530	3540	3550
	AAAGTAAAG	TGAAGTCTCT	CAGTCGTGTC	CGACTCCTAG	CAACCCCATG
	3560	3570	3580	3590	3600
	GAATGCCAGG	CTCCTCCATC	CATGGGATT	TCCAGGCAAG	AGTACTGGAG
	3610	3620	3630	3640	3650
40	TGGGTTGCCA	TTGCCTTCTC	CAACCAAATA	TACTATTAAA	CCCTATATT
	3660	3670	3680	3690	3700
	CAGTGTATCC	ACTTTGGAA	CCTAAATCAA	ACCCTCATTT	GAGATGGCTC
	3710	3720	3730	3740	3750
	ATGCCAACCA	ATATTTCCCA	AGGTACAGAA	AGTTGGGCTC	ATTCAAGCTGA
45	3760	3770	3780	3790	3800
	TTCAAAGATC	TAATAATTG	GTCCTTGTAG	AAAGAAAAAC	TAGATAATGT
	3810	3820	3830	3840	3850
	AAAGTAACCT	AAGTTTCTTC	TCAAAAAACA	AATTCAGTTA	TTAATGTGAA
	3860	3870	3880	3890	3900
50	ACAAAAAGTT	ATTCGTTCCCT	TTGTGACCTC	TGCTGCTAAG	TCGCTTCAGT
	3910	3920	3930	3940	3950
	CGTGTCCGAC	TCTGTGCGAC	CCCATAGACA	GCAGCCCCACA	AGGCTCCCCC
	3960	3970	3980	3990	4000
	ATCCCTGGGA	TTCTCCAAGC	AAGAACACTG	GAGTGGGTTG	CCATTTCCTT

	4010	4020	4030	4040	4050
	CTCCAATGCA	TGAAAGTGAG	AAGGGAAAGT	GAAGTCGCTC	AGTCATGTCT
5	4060	4070	4080	4090	4100
	GACTCTTAGC	GACCTCATGG	ACTGCAGCCC	ACCAGGCTCC	TCTGTCCATG
	4110	4120	4130	4140	4150
	GGATTTCCA	GGCAAGAGTA	CTGGAGTGGG	GTGCCATTGC	CTTCTCCGTT
	4160	4170	4180	4190	4200
10	GGTGACCTCT	AGATAATGAT	AAATAAATAA	ATAGGAATCA	ACTGACAAGA
	4210	4220	4230	4240	4250
	AAAGTGATTCA	AATAAGATAA	TAGTTTTGGA	TATTGGACA	CTCAAACATAT
	4260	4270	4280	4290	4300
	CAAATATAGA	TGAAAAAAGTT	TCTGAAATGC	TGAGATATTTC	TATTGTTAAA
15	4310	4320	4330	4340	4350
	CTCTTATTTC	CTAAATTGTA	AATAATGATT	GAAGGATCAC	TAATAATCCA
	4360	4370	4380	4390	4400
	GCTTCTTAAC	CAATAGAGTT	CTGTCTGTGC	TAAACCCTAA	GCATCAAAAG
	4410	4420	4430		
	ATGGAAATAT	CTGACAGTAA	GTTACAAAAA	AAGGATCC	3'

20

25

30

35

40

45

50

55

## Anhang 2a

	10	20	30	40	50
5	5' TGCAGATCTT	GACAACCATG	AAACTTCTCA	TCCTTACCTG	TCTTGTGGCT
	60	70	80	90	100
	GTTGCTCTTG	CCACTGAGAT	CACCAGAAC	CCTCTGTACA	AAGGCAAGTC
	110	120	130	140	150
	TCTGAGGAAG	GCGCTGAAGG	AGCATGGGCT	TCTGGAGGAC	TTCCTGAAA
	160	170	180	190	200
10	AACAGCAGTA	TGGCATCAGC	AGCAAGTACT	CCGGCTTCGG	GGAGGTGGCC
	210	220	230	240	250
	AGCGTGCCCC	TGACCAAATA	CCTGGATAGT	CAGTACTTTG	GGAAAATCTA
	260	270	280	290	300
	CCTCGGGACC	CCGCCCCAGG	AGTTCACCGT	GCTGTTGAC	ACTGGCTCCT
	310	320	330	340	350
15	CTGACTTCTG	GGTACCCCTCT	ATCTACTGCA	AGAGCAATGC	CTGCAAAAAC
	360	370	380	390	400
	CACCAGCGCT	TCGACCCCGAG	AAAGTCGTCC	ACCTTCCAGA	ACCTGGCAA
	410	420	430	440	450
	GCCCCGTCT	ATCCACTACG	GGACAGGCAG	CATGCAGGGC	ATCCTGGGCT
20	460	470	480	490	500
	ATGACACCGT	CACTGTCTCC	AACATTGTGG	ACATCCAGCA	GACAGTAGGC
	510	520	530	540	550
	CTGAGCACCC	AGGAGCCCGG	GGACGTCTTC	ACCTATGCCG	AATTTGACGG
	560	570	580	590	600
25	AATCCTGGGG	ATGGCCTAAC	CCTCGCTCGC	CTCAGAGTAC	TCGATAACCG
	610	620	630	640	650
	TGTTTGACAA	CATGATGAAC	AGGCACCTGG	TGGCCCAAGA	CCTGTTCTCG
	660	670	680	690	700
	GTTTACATGG	ACAGGAATGG	CCAGGAGAGC	ATGCTCACGC	TGGGGCCAT
	710	720	730	740	750
30	CGACCCGTCC	TACTACACAG	GGTCCCTGCA	CTGGGTGCC	GTGACAGTGC
	760	770	780	790	800
	AGCAGTACTG	GCAGTTCACT	GTGGACAGTG	TCACCATCAG	CGGTGTGGTT
	810	820	830	840	850
	GTGGCCTGTG	AGGGTGGCTG	TCAGGCCATC	CTGGACACGG	GCACCTCCAA
	860	870	880	890	900
35	GCTGGTCGGG	CCCAGCAGCG	ATATCCTCAA	CATCCAGCAG	GCCATTGGAG
	910	920	930	940	950
	CCACACAGAA	CCAGTACGGT	GAGTTTGACA	TCGACTGCGA	CAACCTGAGC
	960	970	980	990	1000
	TACATGCCA	CTGTGGTCTT	TGAGATCAA	GGAAAATGT	ACCCACTGAC
40	1010	1020	1030	1040	1050
	CCCCTCCGCC	TATACCAAGCC	AGGACCAGGG	CTTCTGTACC	AGTGGCTTC
	1060	1070	1080	1090	1100
	AGAGTGAAAA	TCATTCCCAG	AAATGGATAC	TGGGGGATGT	TTTCATCCGA
	1110	1120	1130	1140	1150
45	GAGTATTACA	GCCTCTTGA	CAGGGCCAAC	AACCTCGTGG	GGCTGGCAA
	1160	1170	1180	1190	1200
	AGCCATCTGA	GGAGTCAAGT	GAATTCGCGG	CCGCGTCGAC	AAGCTTGAGA
	1210				
	GCTCGGTACC	3'			

50

55

## Anhang 2b

5	10	20	30	40	50
	GGTACCGAGC	TCTCAAGCTT	GTCGACGCGG	CCGCGAATT	ACTTGACTCC
	60	70	80	90	100
	TCAGATGGCT	TTGGCCAGCC	CCACGAGGTT	GTTGGCCCTG	TCAAAGACGC
	110	120	130	140	150
	TGTAATACTC	TCGGATGAAA	ACATCCCCCA	GTATCCATT	CTGGGAATGA
	160	170	180	190	200
10	TTTCACTCT	GGAAGCCACT	GGTACAGAAG	CCCTGGTCCT	GGCTGGTATA
	210	220	230	240	250
	GGCGGAGGGG	GTCAGTGGGT	ACATTTGCC	ATTGATCTCA	AAGACCACAG
	260	270	280	290	300
	TGGGCATGTA	GCTCAGGTTG	TCGCAGTCGA	TGTCAAACTC	ACCGTACTGG
	310	320	330	340	350
15	TTCTGTGTGG	CTCCAATGGC	CTGCTGGATG	TTGAGGATAT	CGCTGCTGGG
	360	370	380	390	400
	CCCGACCAGC	TTGGAGGTGC	CCGTGTCCAG	GATGGCCTGA	CAGCCACCCCT
	410	420	430	440	450
	CACAGGCCAC	AACCACACCG	CTGATGGTGA	CACTGTCCAC	AGTGAACATGC
20	460	470	480	490	500
	CAGTACTGCT	GCAGTGTAC	GGGCACCCAG	TGCAGGGACC	CTGTGTAGTA
	510	520	530	540	550
	GGACGGCTCG	ATGGCCCCCA	GGGTGACCAT	GCTCTCCTGG	CCATTCTGT
	560	570	580	590	600
25	CCATGTAAAC	CGAGAACAGG	TCTTGGGCCA	CCAGGTGCCT	GTTCATCATG
	610	620	630	640	650
	TTGTCAAACA	CGGGTATCGA	GTACTCTGAG	GCGAGCGAGG	GGTAGGCCAT
	660	670	680	690	700
	CCCCCAGGATT	CCGTCAAATT	CGGCATAGGT	GAAGACGTCC	CCGGGCTCCT
	710	720	730	740	750
30	GGGTGCTCAG	GCCTACTGTC	TGCTGGATGT	CCACAATGTT	GGAGACAGTG
	760	770	780	790	800
	ACGGTGTCA	AGCCCAGGAT	GCCCTGCATG	CTGCCTGTCC	CGTAGTGGAT
	810	820	830	840	850
	AGACAGGGGC	TTGCCAGGT	TCTGGAAGGT	GGACGACTTT	CTCGGGTCGA
	860	870	880	890	900
35	AGCGCTGGTG	GTTCGGCAG	GCATTGCTCT	TGCACTAGAT	AGAGGGTACC
	910	920	930	940	950
	CAGAAGTCAG	AGGAGCCAGT	GTCAAACAGC	ACGGTGAAC	CCTGGGGCGG
	960	970	980	990	1000
	GGTCCCGAGG	TAGATTTTCC	CAAAGTACTG	ACTATCCAGG	TAGTTGGTCA
40	1010	1020	1030	1040	1050
	GGGGCACGCT	GGCCACCTCC	CCGAAGCCGG	AGTACTTGCT	GCTGATGCCA
	1060	1070	1080	1090	1100
	TACTCTGTT	TTTGCAGGAA	GTCCTCCAGA	AGCCCAGT	CCTTCAGCGC
	1110	1120	1130	1140	1150
45	CTTCCTCAGA	GACTTGCCTT	TGTACAGAGG	GATTCTGGTG	ATCTCAGTGG
	1160	1170	1180	1190	1200
	CAAGAGCAAC	AGCCACAAAGA	CAGGTAAGGA	TGAGAAGTTT	CATGGTTGTC
	1210				
50	AAGATCTGCA	3'			

## Patentansprüche

1. Rekombinantes DNA-Konstrukt zur Expression von Proteinen in der Milchdrüse transgener Säugetiere und nachfolgender Sekretion in die Milch, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgenden DNA-Bereiche in der angegebenen Reihenfolge und in funktioneller Verknüpfung zueinander enthält:

55 (1) eine Transkriptions-Kontrollregion aus einem oder mehreren spezifisch in der Milchdrüse aktivierten Genen,

(2) ein erster DNA-Sequenzbereich, der nicht translatiert wird,  
 (3) eine DNA-Sequenz, die für ein Signalpeptid kodiert, das eine Sekretion in die Milch erlaubt,  
 (4) eine DNA-Sequenz, welche die genetische Information für ein heterologes Peptid oder ein Protein enthält und

5       (5) eine DNA-Sequenz, die eine Polyadenylierungsstelle und ein Transkriptions-Terminationssignal enthält.

2. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transkriptions-Kontrollregion aus einem oder mehreren Genen der Caseinfamilie stammt.

10      3. DNA-Konstrukt nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transkriptions-Kontrollregion aus dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen stammt.

15      4. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der erste nicht-translatierte Bereich das Exon I aus einem Gen der Caseingenfamilie, vorzugsweise dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen enthält.

20      5. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der erste nicht-translatierte Bereich das Intron aus einem Gen der Caseingenfamilie, vorzugsweise dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen enthält.

25      6. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß--die für ein Signalpeptid kodierende DNA-Sequenz die Signalsequenz des zu exprimierenden Proteins oder die Signalsequenz eines in die Milch sekretierten Proteins ist.

7. DNA-Konstrukt nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Signalsequenz aus dem  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingen stammt.

30      8. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine DNA-Sequenz (4) enthält, die für ein Peptid oder ein Protein in aktiver Form ohne Fusionsanteil kodiert.

9. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine DNA-Sequenz (4) enthält, die für ein Peptid oder ein Protein in einer inaktiven Vorläuferform ohne Fusionsanteil kodiert.

35      10. DNA-Konstrukt nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine DNA-Sequenz (4) enthält, die für das Prorennin aus dem Rind oder den menschlichen IGF-I kodiert.

11. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zwischen den DNA-Sequenzen (4) und (5) einen zweiten nicht-translatierten Sequenzbereich enthält.

40      12. DNA-Konstrukt nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zweite nicht-translatierte DNA-Sequenzbereich den Exon/Intron-Übergang zwischen dem vorletzten Exon und dem letzten Intron einem Gen der Caseingenfamilie, vorzugsweise des  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-Caseingens enthält.

45      13. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß es an einem 3'-Ende noch zusätzliche nichttranskribierte und nicht-translatierte DNA-Sequenzen enthält.

14. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß es an seinem 5'- und 3'-Ende jeweils eine Restriktionsschnittstelle eines oder mehrerer Enzyme enthält, die innerhalb des DNA-Konstruktions keine Schnittstelle besitzen.

50      15. Rekombinanter Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 14 enthält.

55      16. Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus der Milch transgener Tiere, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder einem rekombinanten Vektor nach Anspruch 15 in die Keimbahn eines Tieres einbringt und das Protein auf übliche Weise

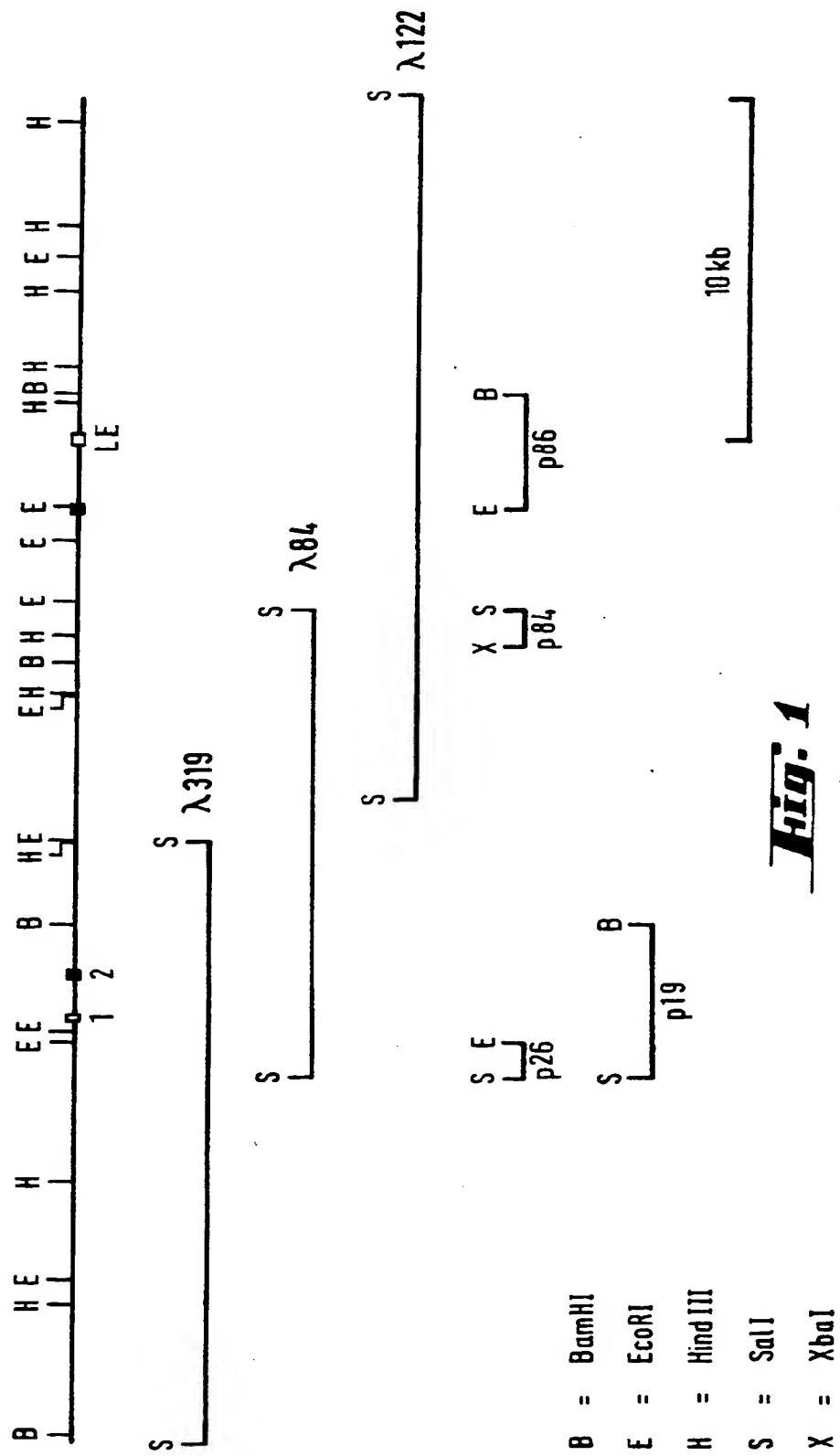
aus der Milch des Tieres oder seiner weiblichen Nachkommen isoliert.

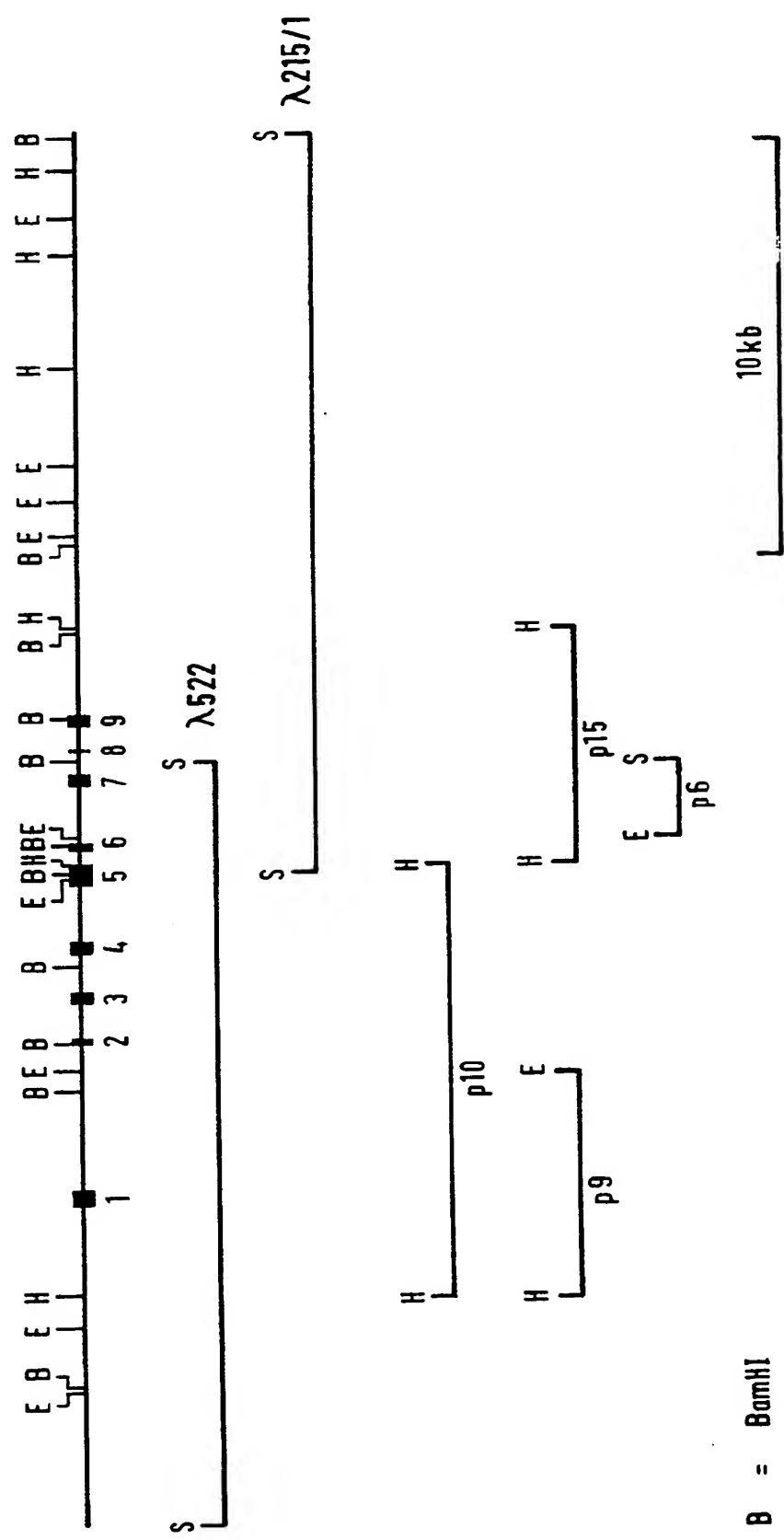
17. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 14 durch Mikroinjektion in die Keimbahn eines Tieres einbringt.
- 5 18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Tier verwendet, in dessen Milch kein endogenes, dem zu exprimierenden Protein homologes Protein vorliegt.
- 10 19. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Tier verwendet, in dessen Milch ein endogenes, dem zu exprimierenden Protein vollständig homologes Protein vorliegt.
- 15 20. Verfahren nach Anspruch 16 zur Gewinnung eines aus zwei oder mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzten Proteinkomplexes, **dadurch gekennzeichnet**, daß man transgene Tiere verwendet, die zwei oder mehrere verschiedene DNA-Konstrukte nach einem der Ansprüche 1 bis 13 in ihrem Genom integriert besitzen.
- 20 21. Verfahren zur Herstellung transgener Tiere, die zwei oder mehrere verschiedene Fremdgene in ihrem Genom integriert besitzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
  - (1) zwei transgene Tiere der gleichen Art, die aber jeweils ein oder mehrere verschiedene Fremdgene in ihrem Genom integriert besitzen, auf übliche Weise herstellt, diese Tiere oder deren Nachkommen miteinander kreuzt und aus den Nachkommen diejenigen transgenen Tiere auswählt, welche gleichzeitig für die verschiedenen Fremdgene beider Elterntiere positiv sind, oder
  - (2) ein transgenes Tier auf übliche Weise herstellt, wobei man ein Fremdgen in die Keimbahn eines Tieres einbringt, das bereits eines oder mehrere andere Fremdgene in seinem Genom integriert besitzt.
- 25 22. Verfahren nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zum Einbringen eines Fremdgens ein DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder einen Vektor nach Anspruch 15 verwendet.
- 30 23. Milch eines transgenen Tieres, das ein oder mehrere rekombinante DNA-Konstrukte nach einem der Ansprüche 1 bis 14 in seinem Genom integriert enthält.
- 35 24. Rekombinantes DNA-Konstrukt, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die DNA-Bereiche (1), (2), (3) und (5) nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und anstelle des DNA-Bereichs (4), welcher die genetische Information für ein heterologes Peptid oder ein Protein enthält, eine Klonierungsstelle enthält.
- 40 25. DNA-Konstrukt nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß es einen oder mehrere weitere DNA-Bereiche nach einem der Ansprüche 11 bis 14 enthält.
- 45 26. DNA-Konstrukt nach Anspruch 24 oder 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Klonierungsstelle die Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme umfaßt.

45

50

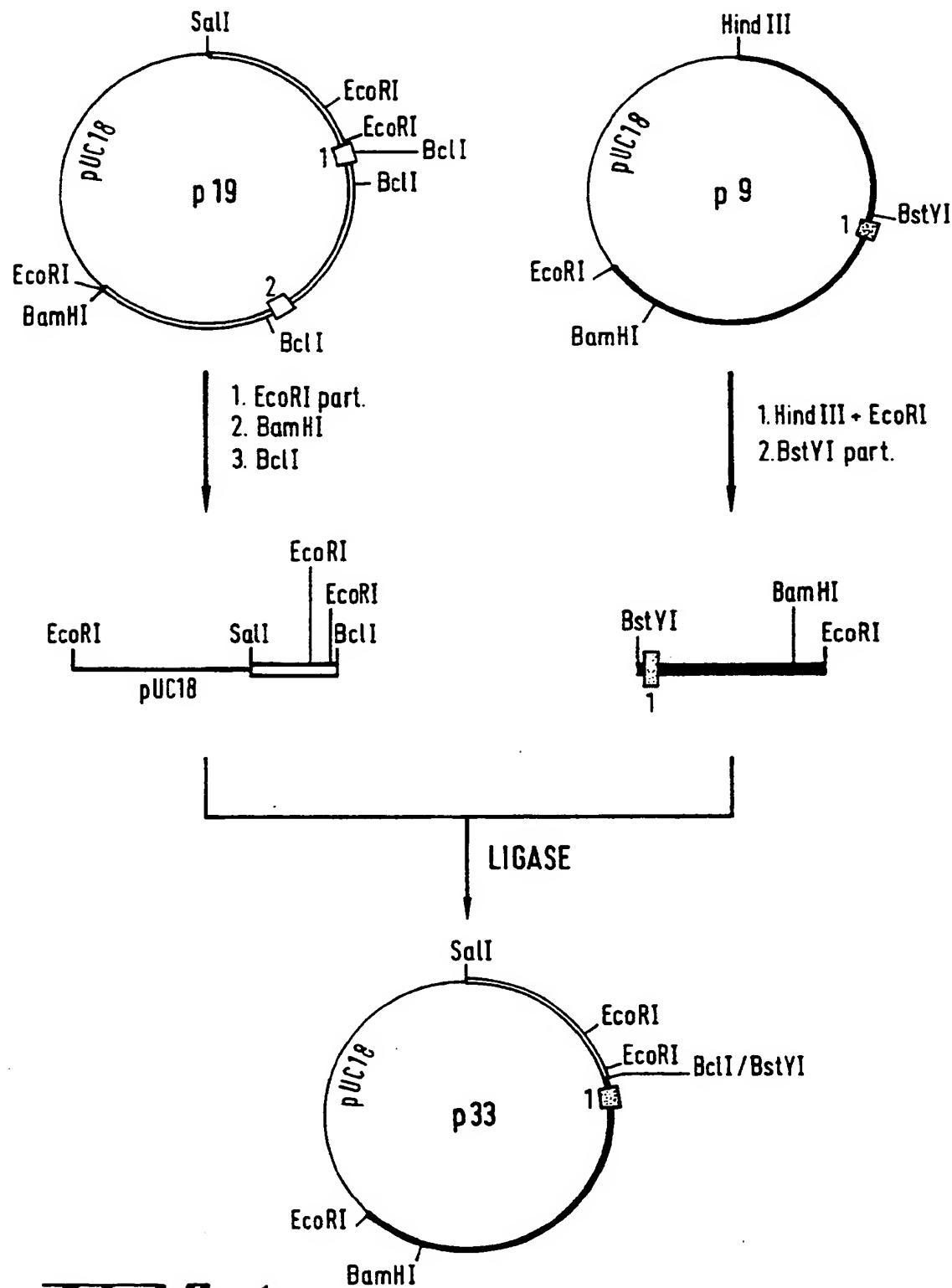
55

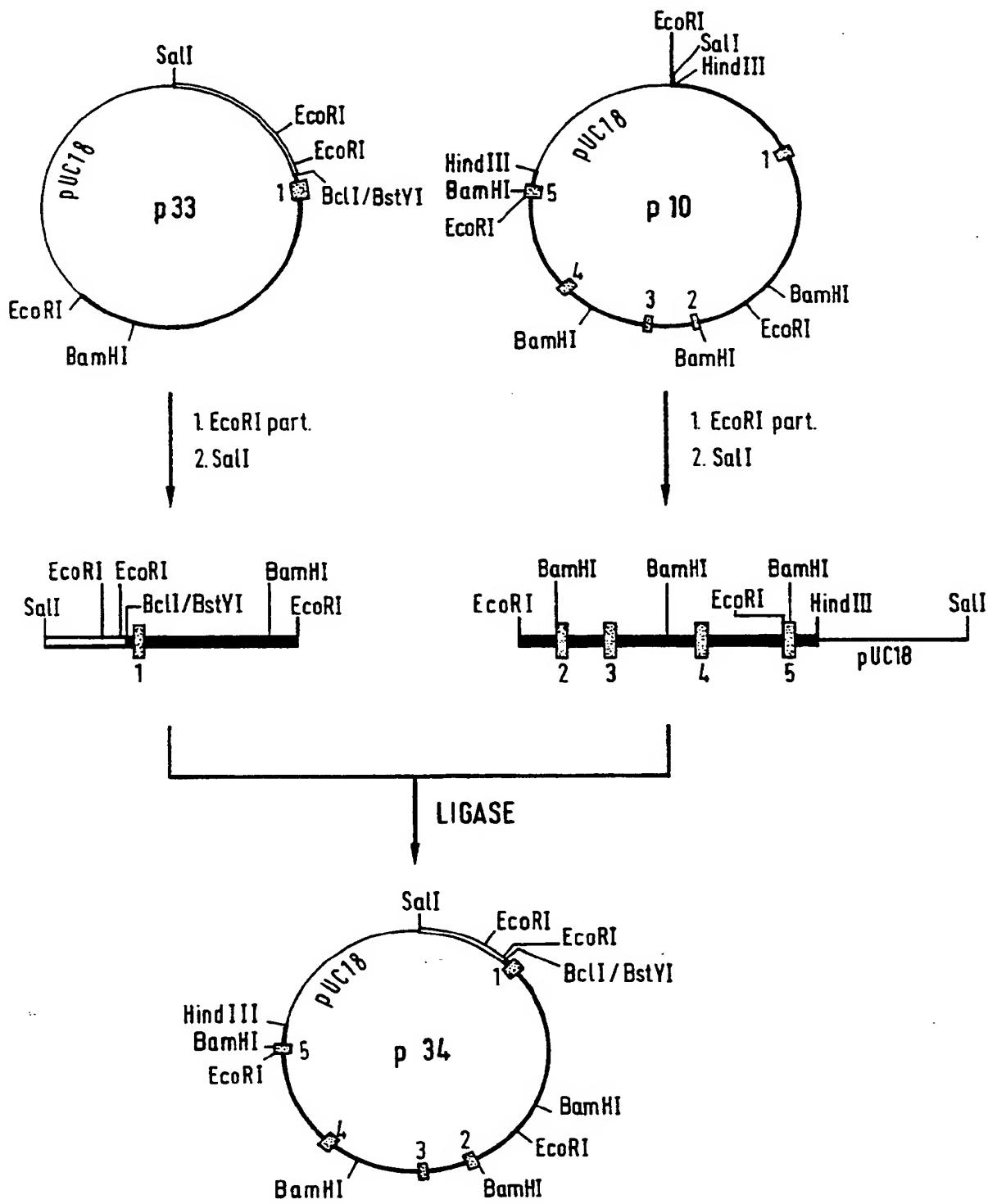
**Fig. 1**

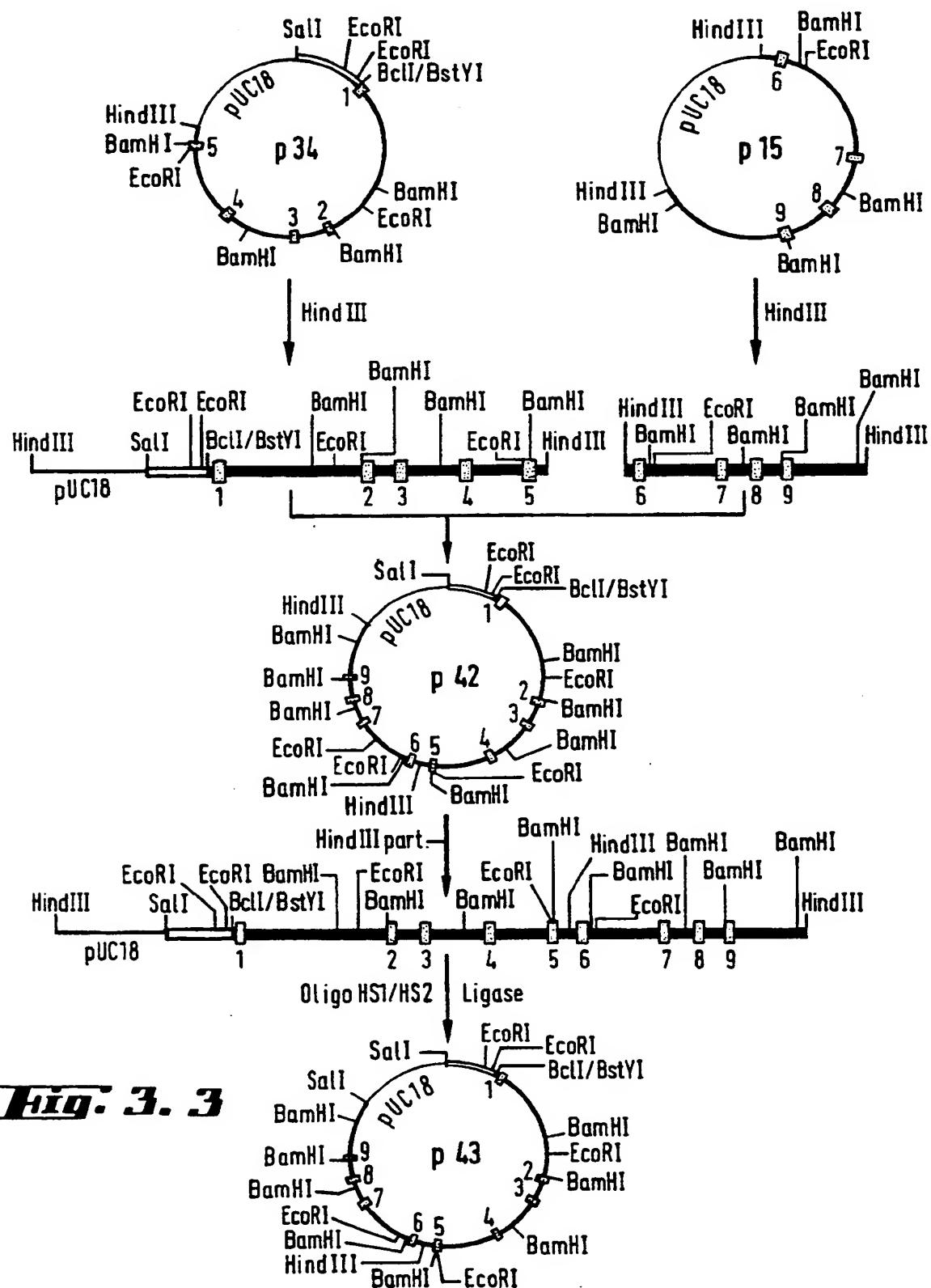


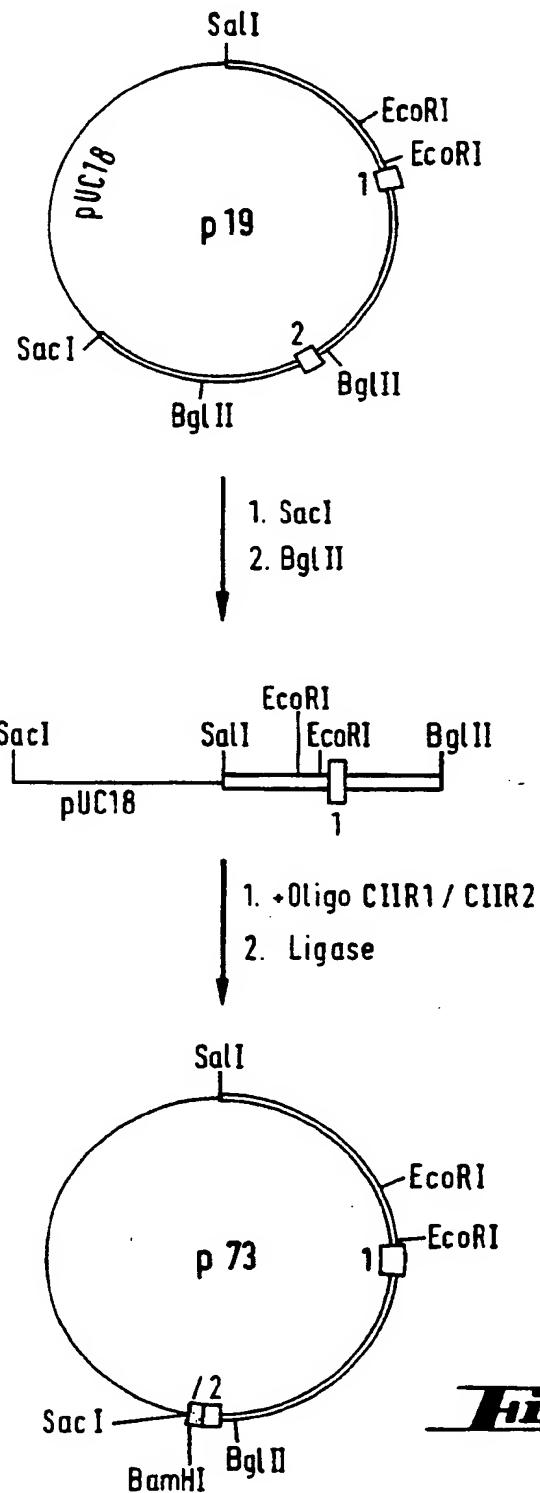
B = BamHI  
 E = EcoRI  
 H = HindIII  
 S = SalI

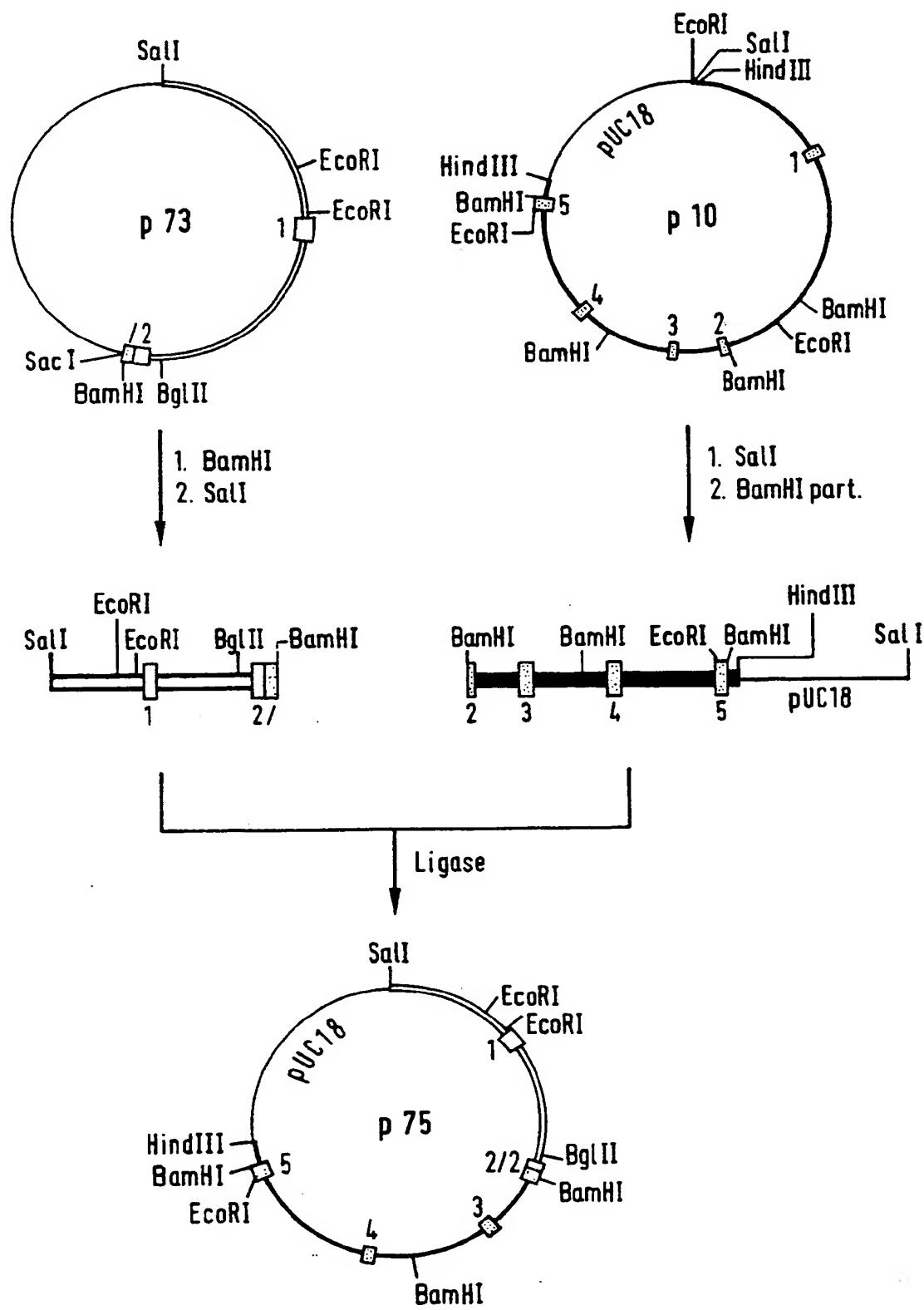
**Fig. 2**

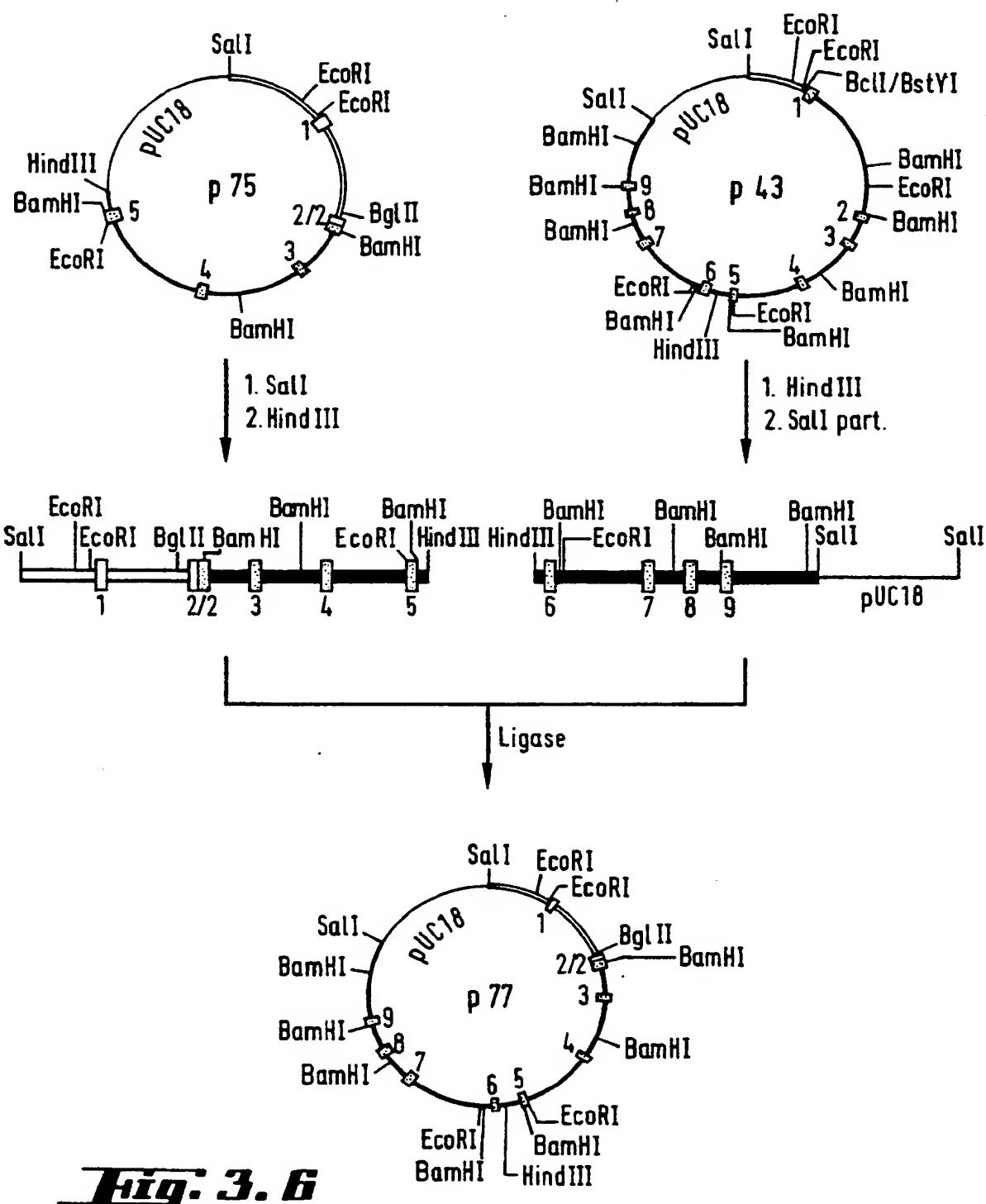
**Fig. 3. 1**

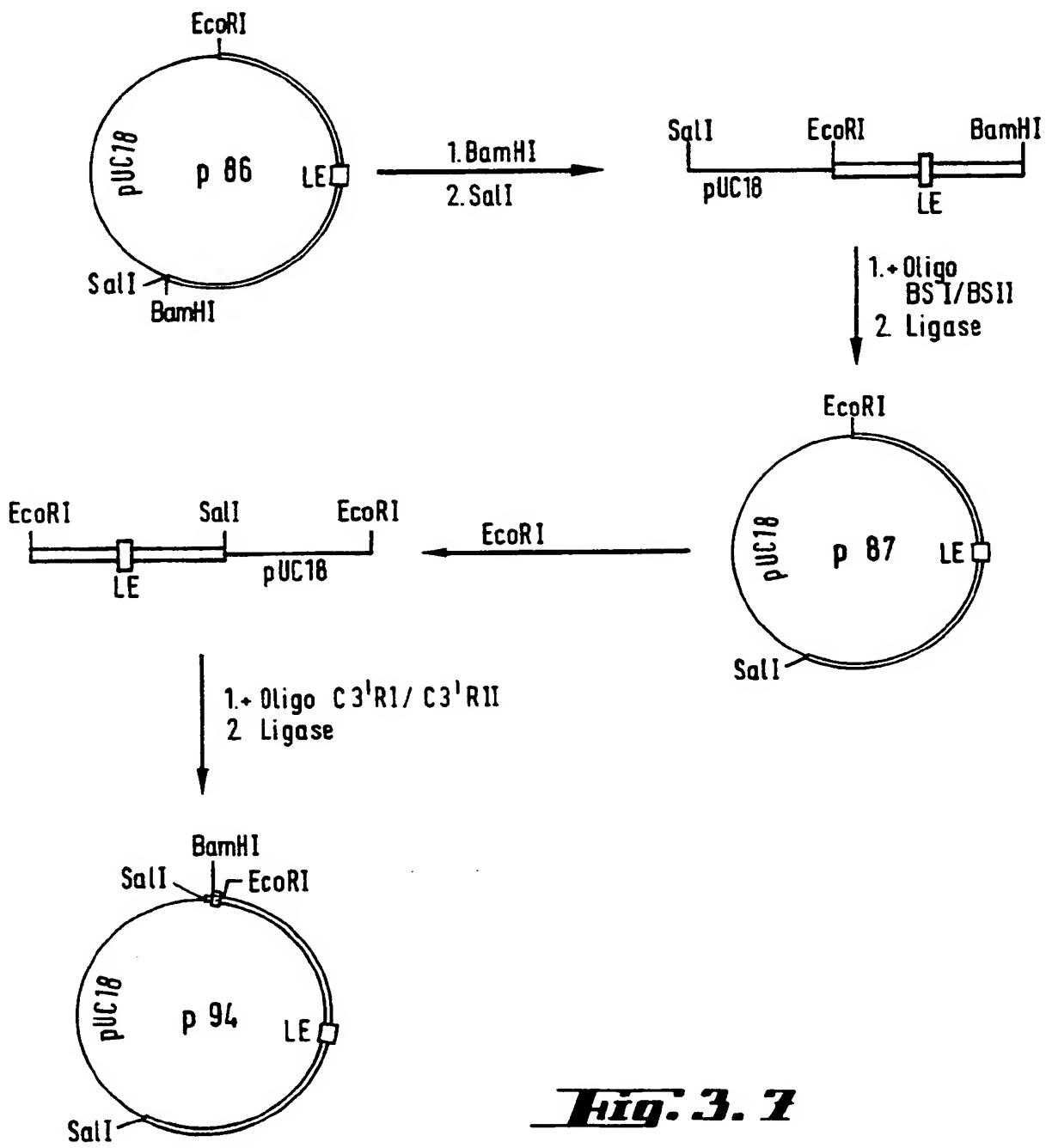
**Fig. 3.2**

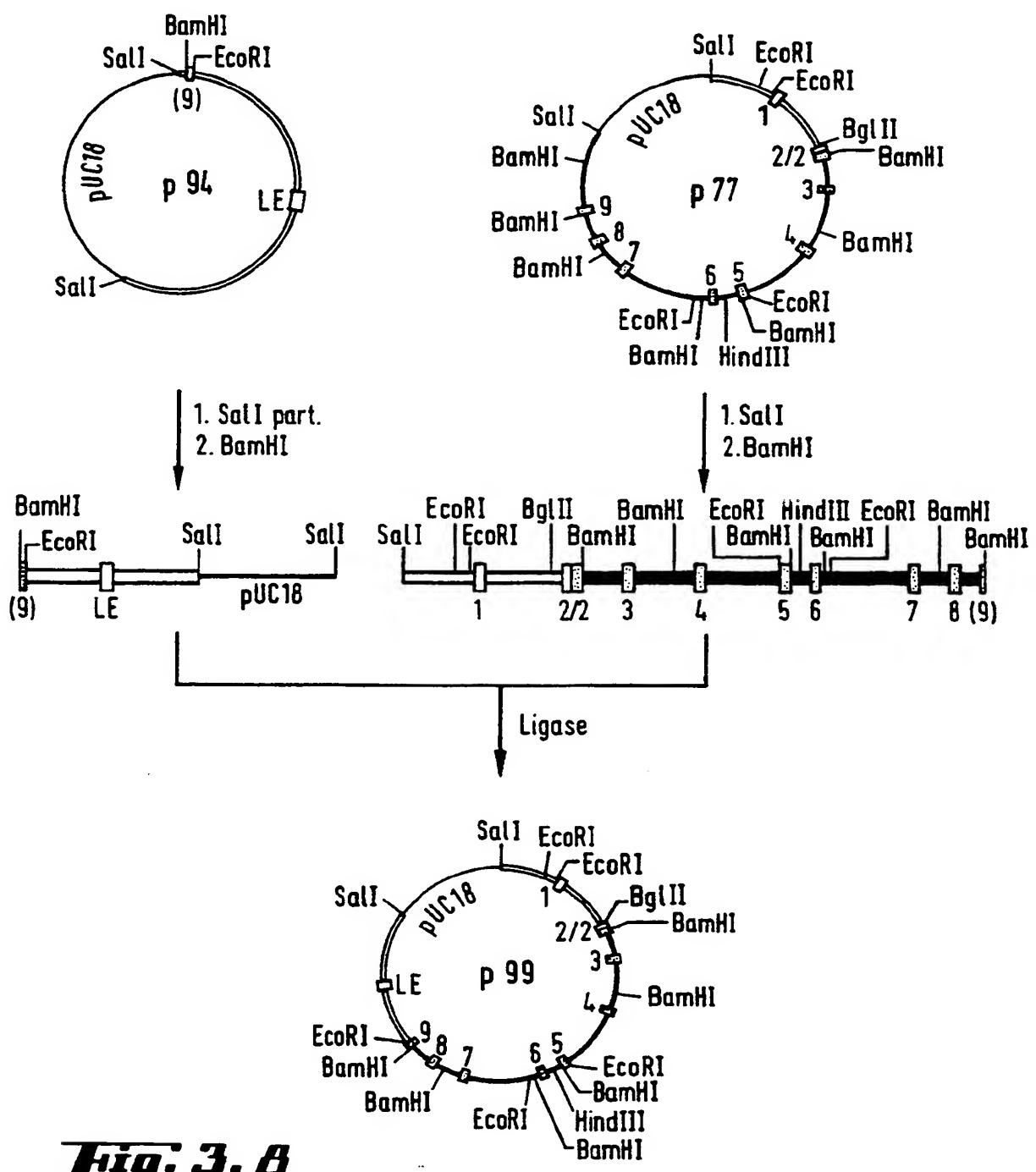
**Fig. 3. 3**

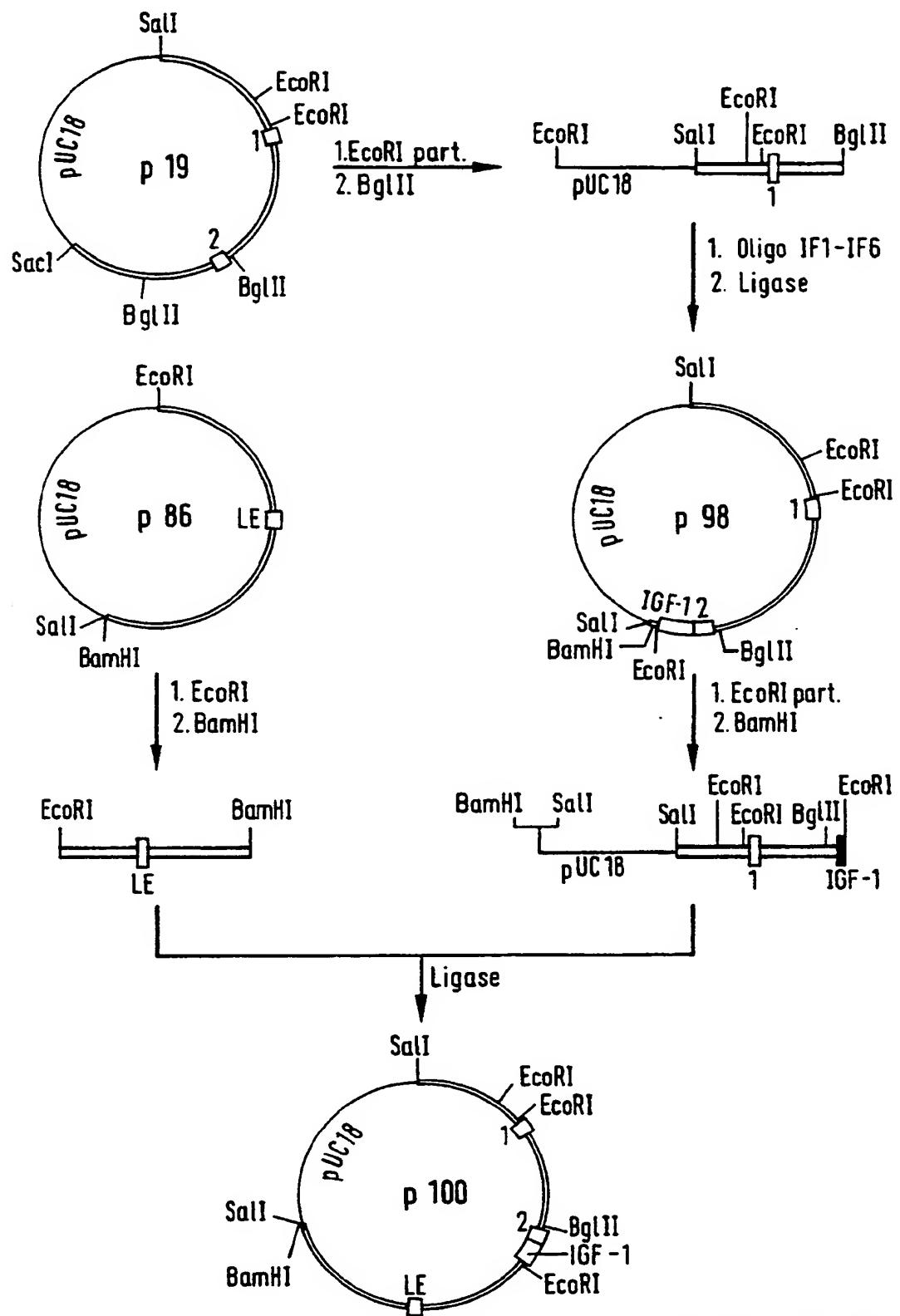
**Fig. 3. 4**

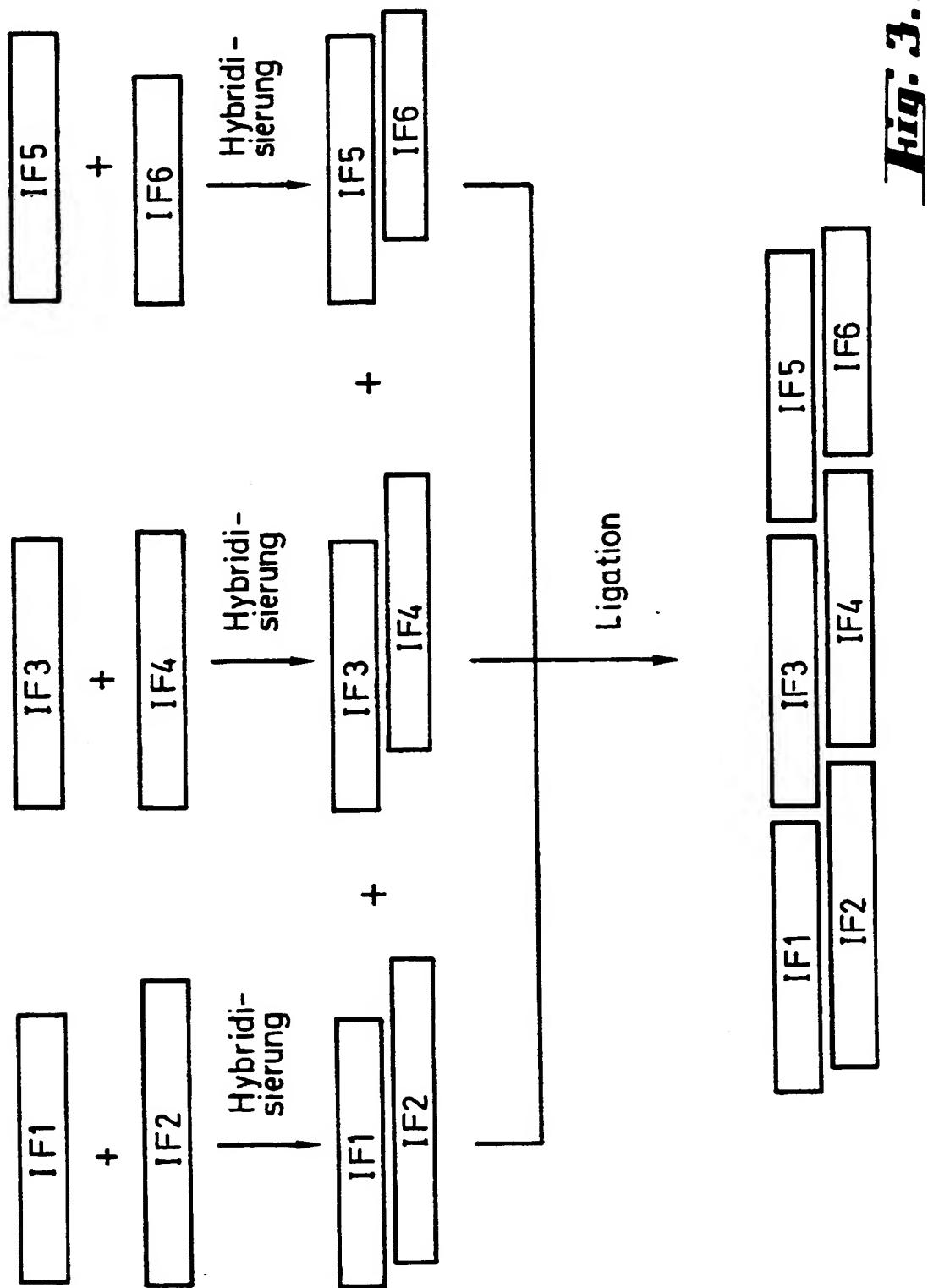
**Fig. 3. 5**



**Fig. 3. 7**

**Fig. 3.8**

**Fig. 3.9**



**Fig. 3. 10 a**

## Signalpeptid

IF1 GAT CTT GAC AAC CAT GAA ACT TCT CAT CCT TAC CTG TCT TGT IF1  
 IF2 AA CTG TTG GTA CTT TGA AGA GTA GGA ATG GAC AGA ACA IF2

## IGF-I

IF1 GGC TGT TGC TCT TGC CGG CCC CGA GAC CCT GTG CGG GGC CGA IF1  
 IF2 CCG ACA ACG AGA ACG GCC GGG GCT CTG GGA CAC GCC CCG GCT IF2

IF1 GCT GGT GGA CGC CCT GCA GTT CGT GTG CGG CGA CCG CGG CTT IF3  
 IF2 CGA CCA CCT GCG GGA CGT CAA GCA CAC GCC GCT GGC GCC GAA IF4

IF3 CTA CTT CAA CAA GCC CAC CGG CTA CGG CTC CAG CTC CCG CCG IF3  
 IF4 GAT GAA GTT GTT CGG GTG GCC GAT GCC GAG GTC GAG GGC GGC IF4

IF3 GGC CCC CCA GAC CGG CAT CGT GGA CGA GTG CTG CTT CCG GAG IF5  
 IF4 CCG GGG GGT CTG GCC GTA GCA CCT GCT CAC GAC GAA GGC CTC IF6

IF5 CTG CGA CCT GCG CCG GCT GGA GAT GTA CTG CGC CCC CCT GAA IF5  
 IF6 GAC GCT GGA CGC GGC CGA CCT CTA CAT GAC GCG GGG GGA CTT IF6

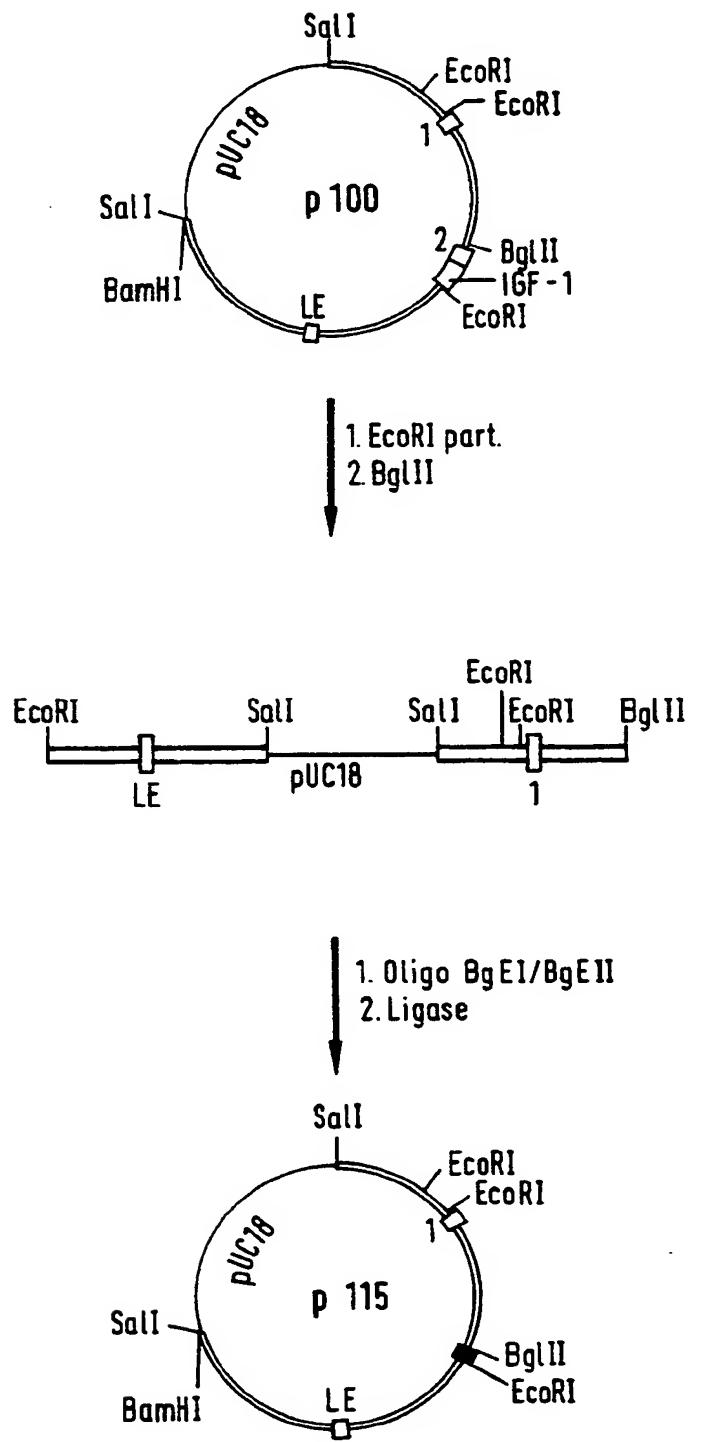
## IGF-I

## 3'- Caseinbereich

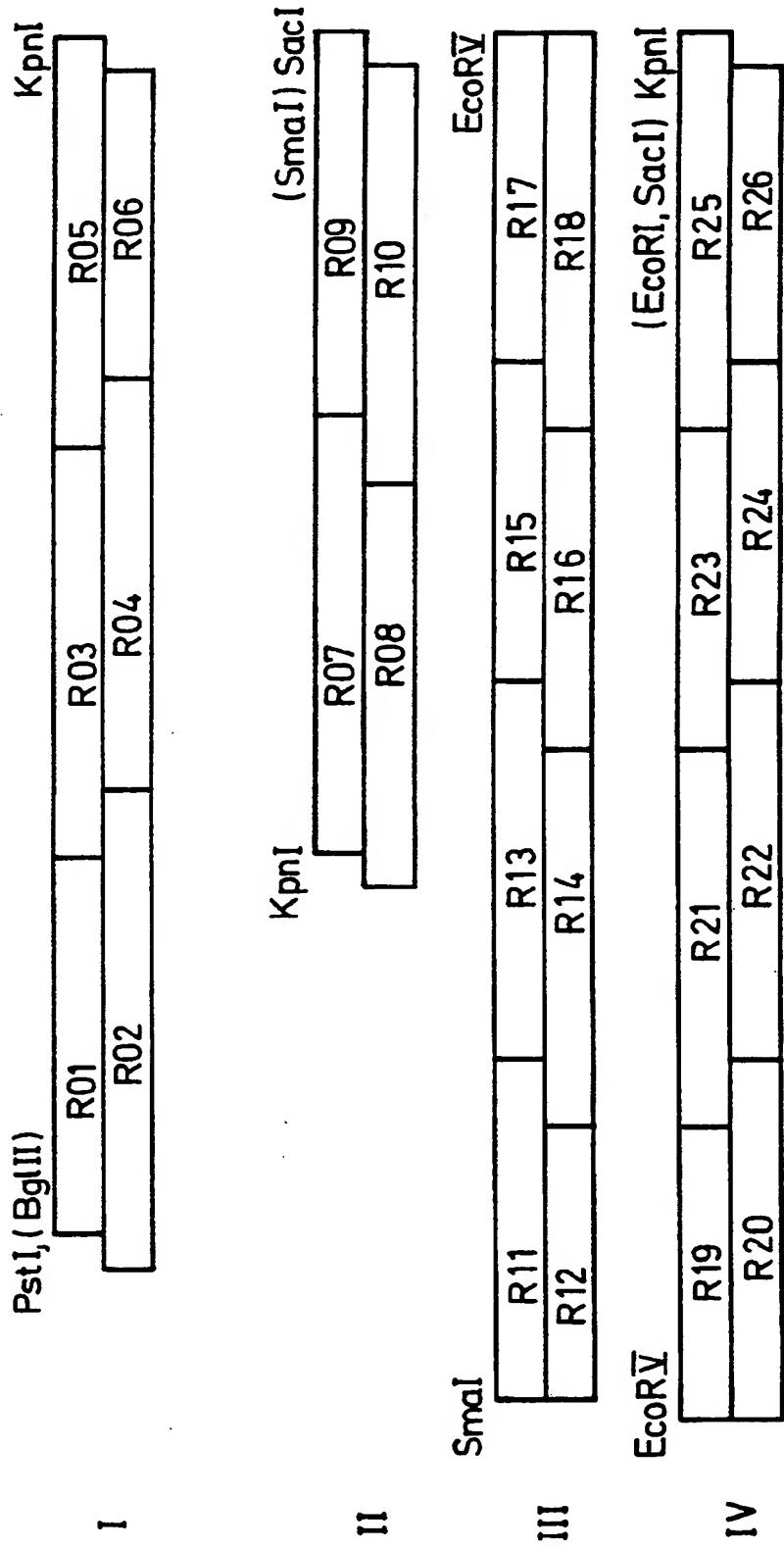
IF5 GCC CGC CAA GTC CGC CTG AGG AGT CAA GTG AAT TCC GCG GGA IF5  
 IF6 CGG GCG GTT CAG GCG GAC TCC TCA GTT CAC TTA AGG CGC CCT IF6

IF5 TCC GTC GAC IF5  
 IF6 AGG CAG CTG TTA A IF6

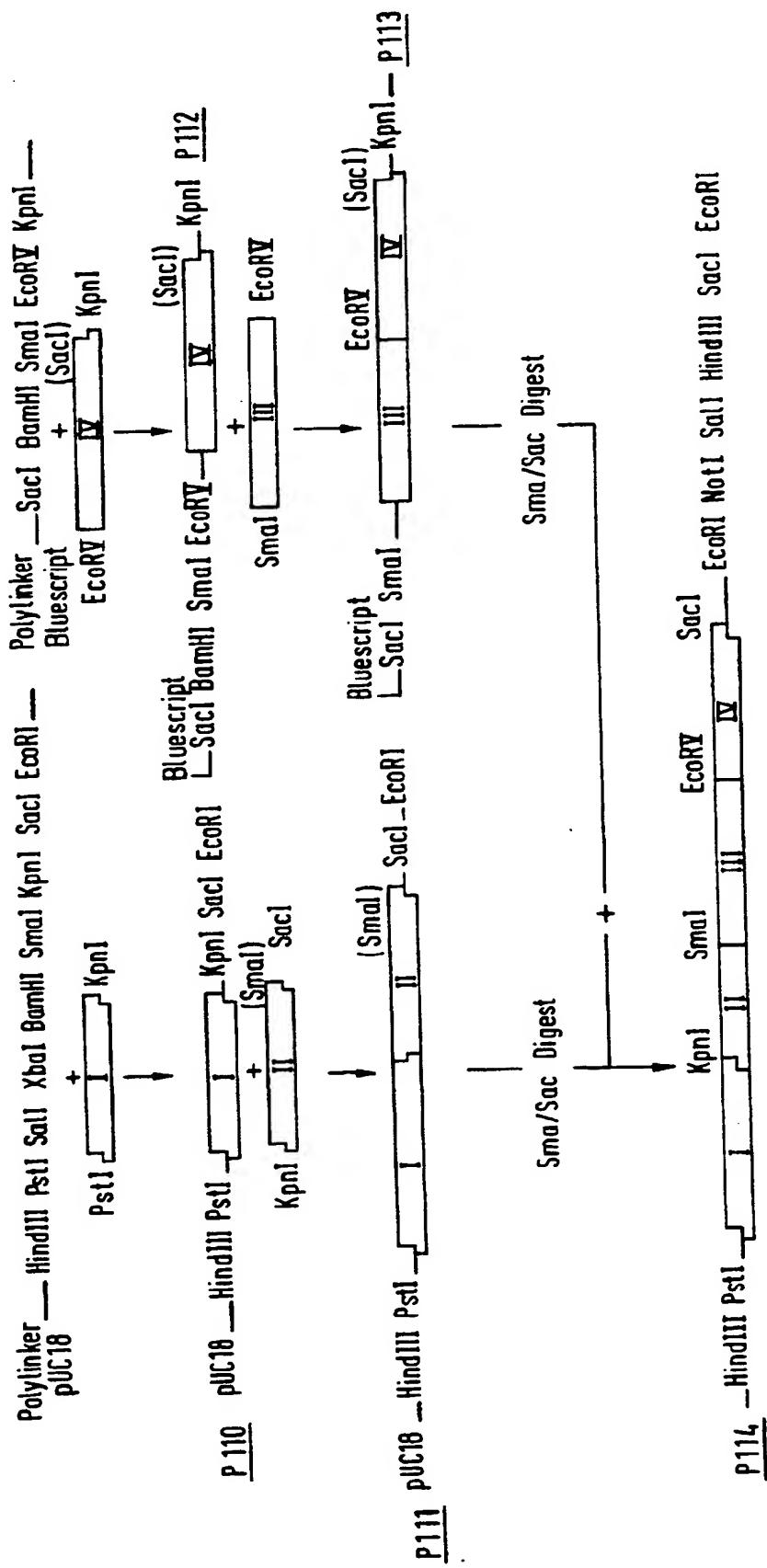
***Fig. 3. 10b***

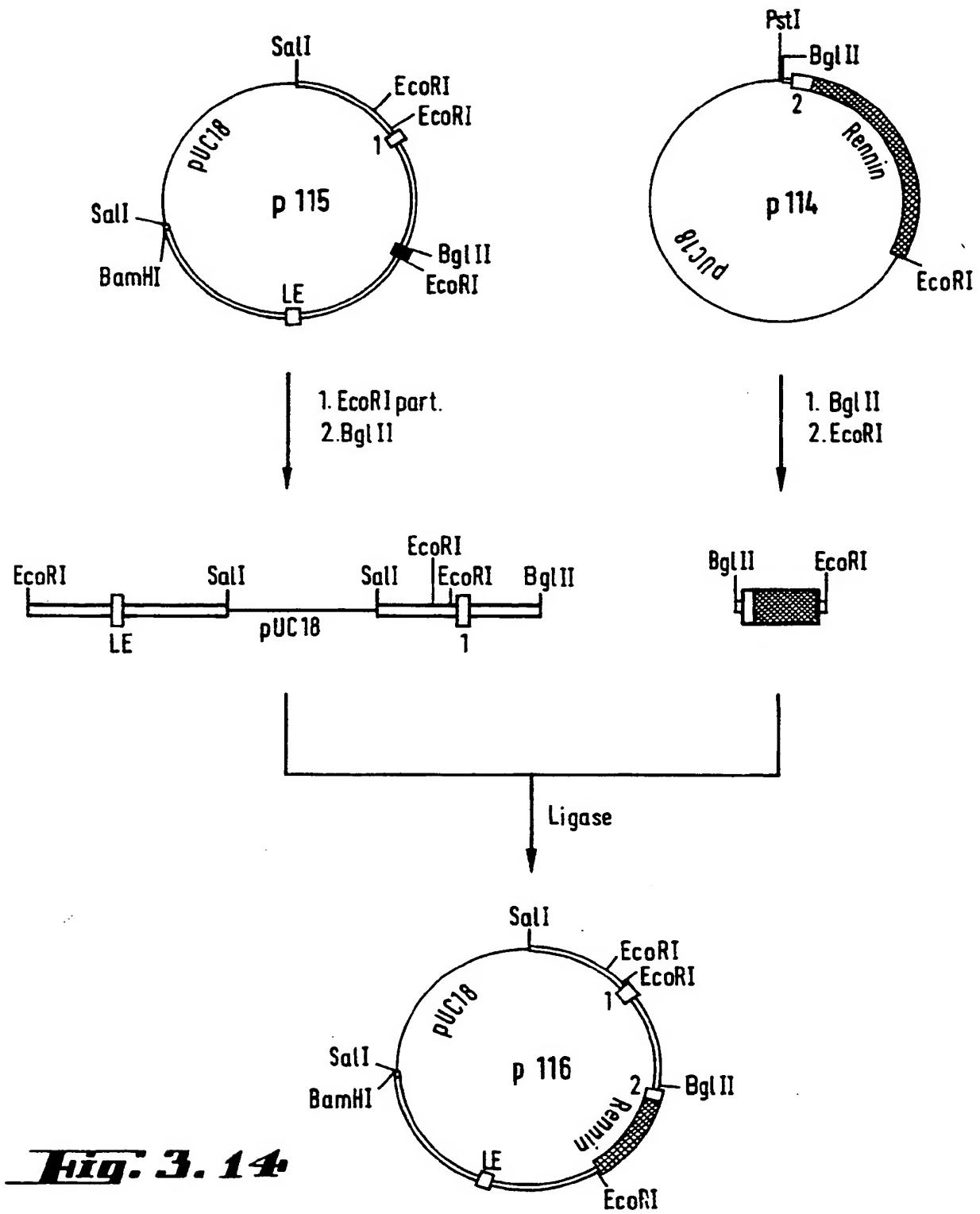


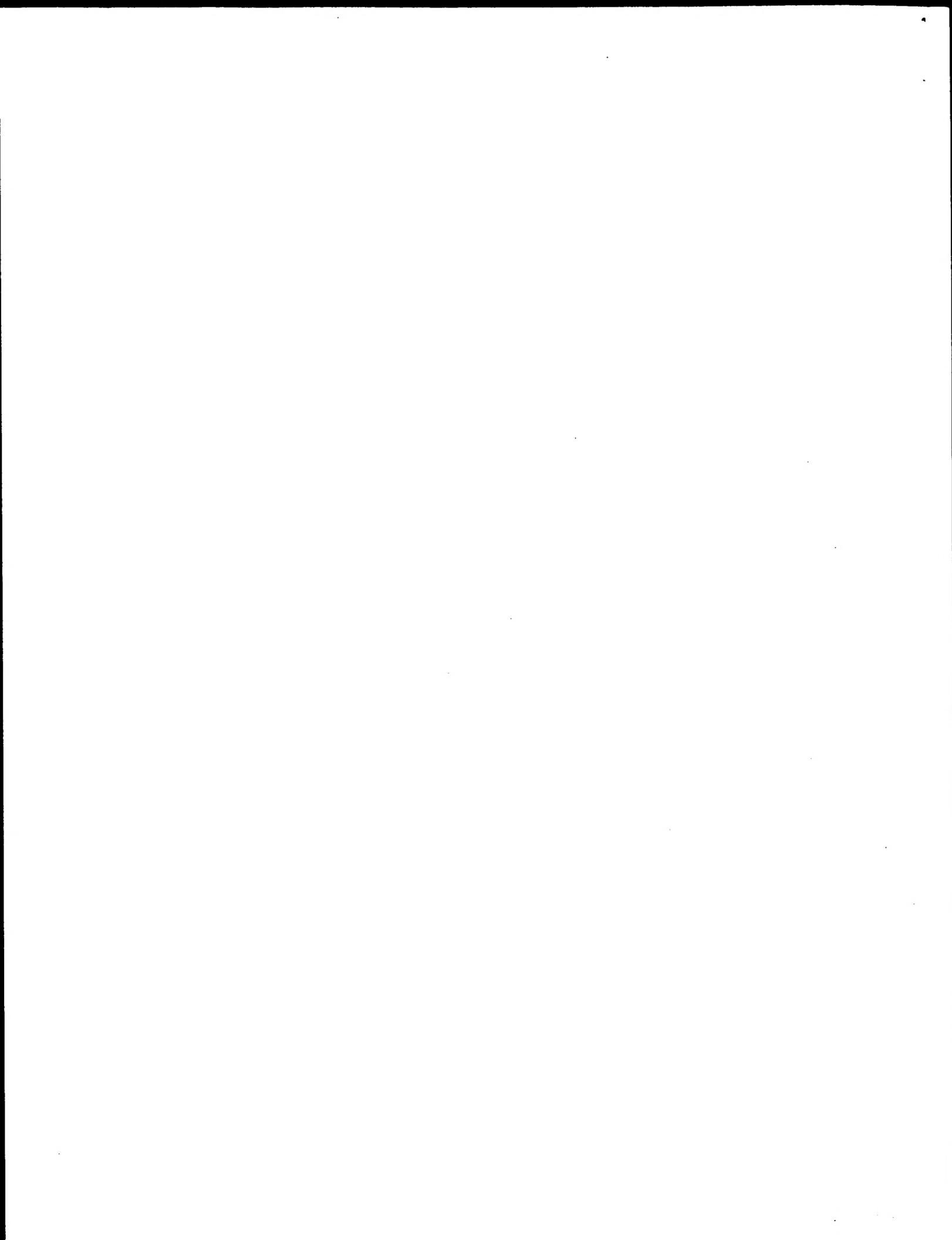
**Fig. 3.11**



**Fig. 3.12**

Fig. 3.13







Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 451 823 A3**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑯ Anmeldenummer: **91105702.4**

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 15/85, C12N 15/12,  
C07H 21/04, C12P 21/00**

⑯ Anmeldetag: **10.04.91**

⑯ Priorität: **11.04.90 DE 4011751  
19.04.90 DE 4012526**

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**16.10.91 Patentblatt 91/42**

⑯ Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE**

⑯ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: **22.01.92 Patentblatt 92/04**

⑯ Anmelder: **Consortium für elektrochemische  
Industrie GmbH  
Zielstattstrasse 20  
W-8000 München 70(DE)**

⑯ Erfinder: **Hartl, Peter, Dr. Dipl.-Chem.  
Kruenerstrasse 89  
W-8000 München 70(DE)**  
Erfinder: **Brem, Gottfried, Prof. Dr. Dr.  
Larezhausen  
W-8893 Hilgertshausen(DE)**

⑯ **DNA-Konstrukte zur Expression von Proteinen in der Milchdrüse transgener Säugetiere.**

⑯ Die Erfindung betrifft ein rekombinantes DNA-Konstrukt zur Expression von Proteinen in der Milchdrüse transgener Säugetiere und nachfolgender Sekretion in die Milch, das die folgenden DNA-Bereiche in der angegebenen Reihenfolge und in funktioneller Verknüpfung zueinander enthält:

- (1) eine Transkriptions-Kontrollregion aus einem oder mehreren spezifisch in der Milchdrüse aktivierte Genen,
- (2) ein erster DNA-Sequenzbereich, der nicht translatiert wird,
- (3) eine DNA-Sequenz, die für ein Signalpeptid kodiert, das eine Sekretion in die Milch erlaubt,
- (4) eine DNA-Sequenz, welche die genetische Information für ein heterologes Peptid oder ein Protein enthält und
- (5) eine DNA-Sequenz, die eine Polyadenylierungsstelle und ein Transkriptions-Terminationssignal enthält.

Die Erfindung betrifft weiterhin einen rekombinanten Vektor, der ein solches Konstrukt enthält, sowie Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus der Milch transgener Tiere, in deren Genom ein erfundungsgemäßes DNA-Konstrukt integriert ist.

EP 0 451 823 A3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 91105702.4
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
D, X	<u>EP - A - 0 264 166</u> (INTEGRATED GENETICS) * Patentansprüche * --	1, 16	C 12 N 15/85 C 12 N 15/12 C 07 H 21/04 C 12 P 21/00
A, D	<u>WO - A - 88/00 239</u> (PHARMACEUTICAL PROTEINS) * Patentansprüche * --	1, 16, 17	
D, A	<u>EP - A - 0 279 582</u> (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) * Patentansprüche 1, 2, 25 * --	1-3, 16	
D, A	<u>WO - A - 88/01 648</u> (IMMUNEX CORPORATION) * Patentansprüche 1, 2, 12, 13 * --	1, 16	
D, A	<u>WO - A - 88/10 118</u> (BIOGEN) * Patentansprüche 7-9 * ----	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl.)
			C 12 N C 07 H C 12 P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN	Abschlußdatum der Recherche 21-11-1991	Prüfer WOLF	
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	